

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – Plastische  
Operationen

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung einer neuartigen Pflanzenextraktkombination zur Förderung der  
Gewebereneration bei oralen Wundheilungsproblematiken

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Sofia Franziska Schröder  
aus Mannheim

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachterin:

Tag der Promotion: 26.09.2024

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung / Ziel der Dissertation</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Orale Wundheilung</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Die Phasen der Wundheilung.....	2
2.1.2 Die Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung.....	4
2.1.3 Besonderheiten der oralen Wundheilung und Wundheilungsstörungen.....	5
2.1.4 Begünstigende Faktoren für das Auftreten von Wundheilungsstörungen.....	7
2.1.1 Aktuelle Therapiemöglichkeiten.....	9
<b>2.2 Pflanzenextrakte aus <i>Aloe vera</i> und Rhabarberwurzel</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 <i>Aloe vera</i> .....	11
2.2.2 Rhabarberwurzelextrakt.....	14
2.2.3 Kombination von <i>Aloe vera</i> und Rhabarberwurzelextrakt.....	15
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>16</b>
3.1.1 Chemikalien.....	16
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.3 Geräte.....	20
3.1.4 Software.....	21
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Zellkultur.....	22
3.2.2 Ermittlung der Zellzahl.....	23
3.2.3 Isolation von Fibroblasten aus Gewebeproben.....	24
3.2.4 Kryokonservierung der Zellen.....	24
3.2.5 Auftauen der Zellen.....	25
3.2.6 Herstellung von Stocklösungen.....	25
3.2.7 alamarBlue™ Viabilitäts-Assay.....	25
3.2.8 <i>Scratch-Assay</i> .....	29
3.2.9 Phalloidin-Färbung.....	31
3.2.10 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	33
3.2.11 Berechnung des phänomenologischen Kombinationsindex.....	34
3.2.12 Statistische Auswertung.....	34

3.2.13	Grafiken .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellviabilität .....</b>	<b>35</b>
4.1.1	<i>Aloe vera</i> .....	35
4.1.2	Rhabarberwurzelextrakt .....	36
<b>4.2</b>	<b>Scratch-Assay .....</b>	<b>37</b>
4.2.1	<i>Aloe vera</i> .....	37
4.2.2	Rhabarberwurzelextrakt .....	38
4.2.3	<i>Aloe vera</i> und Rhabarberwurzelextrakt – Kombination .....	39
<b>4.3</b>	<b>Phalloidin-Färbung .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Zellzyklusanalyse durch Durchflusszytometrie .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Phänomenologischer Kombinationsindex .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Patent .....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
5.1	<i>Aloe vera</i> .....	44
5.2	Rhabarberwurzelextrakt .....	45
5.3	Kombination aus <i>Aloe vera</i> und Rhabarberwurzelextrakt .....	46
5.4	Diskussion der Methoden .....	48
5.5	Klinischer Ausblick .....	49
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>64</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest.	Aqua destilliert
AV	<i>Aloe vera</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)scanning
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
h	<i>hour/s</i> (Stunde/n)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ms	Millisekunden
OLP	Oraler Lichen planus
P	Passage
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PDGF	<i>Plateled-derived growth factor</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RWE	Rhabarberwurzelextrakt
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
T/E	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
$\alpha$ -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
$\mu$ l	Mikroliter

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarisches Bild des <i>alamarBlue</i> <sup>TM</sup> Viabilitätsassay am Beispiel der Behandlung mit RWE.....	28
Abbildung 2: Viabilität von Fibroblasten nach einer Behandlung von mit AV.....	36
Abbildung 3: Viabilität von Fibroblasten nach einer Behandlung von mit RWE. ....	37
Abbildung 4: Effekt von AV auf die Migration von Fibroblasten. ....	38
Abbildung 5: Effekt von RWE auf die Migration von Fibroblasten.....	39
Abbildung 6: Effekt von AV und RWE auf die Migration von Fibroblasten.....	40
Abbildung 7: Beispielfotos Repräsentative Bilder der Phalloidin-Färbung mit verschiedenen Behandlungsgruppen mit AV und RWE.....	41
Abbildung 8: Phalloidin-Färbung von Fibroblasten mit AV und RWE. ....	42
Abbildung 9: Zellzyklusverteilung von Fibroblasten nach der Behandlung mit AV und RWE.....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Chemikalien und deren Hersteller .....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung gelöster Chemikalien .....	17
Tabelle 3: Bestandteile von AV .....	18
Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller .....	19
Tabelle 5: verwendete Geräte und deren Hersteller .....	20
Tabelle 6: verwendete Software und deren Hersteller .....	21
Tabelle 7: Plattenbelegung Viabilitätsassay mit AV .....	27
Tabelle 8: Plattenverteilung Viabilitätsassay mit RWE.....	28
Tabelle 9: Behandlungsgruppen <i>Scratch-Assay</i> AV .....	30
Tabelle 10: Behandlungsgruppen <i>Scratch-Assay</i> AV und RWE.....	31
Tabelle 11: Behandlungsgruppen Phalloidin-Färbung AV und RWE.....	32

## 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Im Zentrum dieser Dissertation stand es, die potenziell heilenden Eigenschaften von zwei Pflanzenextrakten in Bezug auf orale Wundheilungsstörungen *in vitro* zu erforschen.

Die Wundheilung ist ein sehr komplexer Prozess (1), der in der Mundhöhle unter besonderen Bedingungen in einem warmen, feuchten Milieu mit Millionen von Mikroorganismen (2, 3) bewerkstelligt wird. Da Fibroblasten für die Produktion extrazellulärer Matrix im Bindegewebe zuständig sind und damit wesentlich zur Wundheilung beitragen (4), lag der Fokus dieser Dissertation auf *in vitro*-Versuchen mit Fibroblasten. Für diese Dissertation wurden Extrakte aus *Aloe vera* (AV) und Rhabarberwurzelextrakt (RWE) ausgewählt. Die Hypothese dieser Dissertation lautete, dass die Anwendung einer Pflanzenextraktkombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel eine Therapieoption bei oralen Wundheilungsproblematiken darstellen könnte.

Das Ziel der Dissertation war es, die genannten Pflanzenextrakte hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Migration und Viabilität humaner Fibroblasten zu testen, während in Vorarbeiten bereits ihre antibakterielle Wirkung gezeigt werden konnte. Es ist bekannt, dass das häufig im zahnmedizinischen Bereich verwendete Chlorhexidin zwar antibakteriell (5), jedoch auch zytotoxisch wirkt (6). Die neuartige Pflanzenextraktkombination hingegen sollte antibakterielle Eigenschaften mit regenerationsfördernden verbinden.

*Aloe vera* wird traditionell wegen ihrer vielseitigen entzündungshemmenden Aktivität und immunmodulatorischen Wirkung (7-9) verwendet. Rhabarberwurzel, eine traditionelle Heilpflanze aus Asien und dem Nahen Osten, ist dafür bekannt, dass sie eine antibakterielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Bakterien (10-12) sowie entzündungshemmende und antifibrotische Eigenschaften (13, 14) aufweist.

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Viabilität von Fibroblasten analysiert. In einem zweiten Schritt wurden Fibroblasten unter dem Einfluss der Pflanzenextrakte in einem *Scratch-Assay* auf ihr Migrationsverhalten hin untersucht. Dabei wurde zudem die Kombination aus beiden Extrakten verwendet. Anschließend wurde mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert, ob die verwendeten Stoffe Einfluss auf den Zellzyklus der Fibroblasten nahmen. Des Weiteren wurden die Zellen mit Phalloidin angefärbt, um eine mögliche Veränderung der Aktinfilamente festzustellen.

Die oben genannten Methoden wurden verwendet, um eine neuartige Pflanzenextraktkombination zur Therapie oraler Wundheilungsproblematiken zu finden.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Orale Wundheilung**

#### *2.1.1 Die Phasen der Wundheilung*

Wunden können durch pathologische Prozesse extern oder intern im betroffenen Organ entstehen. Eine Wunde entsteht iatrogen, traumatisch bedingt oder resultiert aus einer Erkrankung. Unerheblich woher die Wunde kommt und in welcher Form sie vorliegt, wird jedoch immer das Gewebe und damit auch das lokale Umfeld beschädigt (15). Es besteht ein Unterschied zwischen den Begriffen Wundheilung, der Reparation, und der Regeneration. Bei der Regeneration handelt sich dabei zwar um eine Erneuerung des Gewebes, bei der Wundheilung bzw. Reparation kann dieses aber eine geringere Funktionalität aufweisen, indem beispielsweise Narbengewebe entsteht (16).

Zunächst soll hier auf die dermale Wundheilung eingegangen werden, da diese in der Literatur besser charakterisiert ist. Prinzipiell handelt es sich bei der Wundheilung um einen kontinuierlichen Prozess, dessen unterschiedliche Phasen fließend ineinander übergehen. Die vier Phasen werden unter den Begriffen „Gerinnung und Hämostase“, „Entzündung“, „Proliferation“ und „Umstrukturierung der Wunde zu Narbengewebe“ zusammengefasst (17).

Die erste, die hämostatische Phase wird unmittelbar durch Gewebeverletzungen veranlasst (18). Nach einer Verletzung ziehen sich die Gefäße rasch zusammen. Dadurch wird versucht, die Blutung aus dem gerissenen Mikrogefäßsystem zu verringern. Dies geschieht durch eine reflexartige Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, ausgelöst durch Vasokonstriktoren wie Endothelin, die vom geschädigten Endothel freigesetzt werden (19). Die Blutgerinnung wird ausgelöst und ein Blutgerinnsel entsteht lokal an der Stelle der Verletzung, um diese zu verschließen. Thrombozyten lagern sich mit anderen Blutzellen wie neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten zusammen und werden dann auch als Blutkoagel bezeichnet. Außerdem bildet sich ein Netz aus Fibrin, eines der Hauptkomponenten der neuen extrazellulären

Matrix, welches in Kombination mit dem Zellen-Konglomerat häufig als provisorische extrazelluläre Matrix bezeichnet wird. Diese wird später durch das Granulationsgewebe ersetzt (2).

Die Entzündungsphase oder Inflammationsphase verläuft parallel zur blutstillenden Phase, weshalb beide Phasen manchmal auch zusammengefasst werden. Neutrophile Granulozyten werden durch Chemokine, das Komplementsystem und durch Peptide angezogen, die bei der Spaltung von Fibrinogen freigesetzt werden. Die Extravasation und Migration von Zellen in das umgebende Gewebe wird durch die Endothelzellen gesteuert (20). Die neutrophilen Granulozyten sind wichtig, um mit ihrer bakteriziden Funktion eine mikrobielle Invasion von außen zu verhindern (21). Während der ersten beiden Phasen verlassen auch zirkulierende Monozyten den Blutkreislauf und wandern in das Gewebe ein, wo sie sich nach einer Konditionierung durch lokale Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine und mikrobielle Produkte zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Die Rekrutierung von Monozyten ist für die wirksame Bekämpfung und Beseitigung von Virus-, Bakterien-, Pilz- und Protozoeninfektionen von entscheidender Bedeutung (22). Neutrophile Granulozyten und Monozyten erscheinen innerhalb von einer bzw. 24 Stunden (h) an den Defektstellen (2).

Die nächste Phase der Wundheilung, die Proliferationsphase, setzt 2-10 Tage nach der Verwundung ein und ist durch Zellproliferation und Migration unterschiedlicher Zellen gekennzeichnet. Zuerst wandern die Keratinozyten über die verletzte Dermis ein. Anschließend bilden sich neue Blutgefäße (Neoangiogenese), und die mit Fibroblasten und Makrophagen verbundenen Kapillarsprossen ersetzen die Fibrinmatrix durch Granulationsgewebe, das in späteren Stadien des Reparaturprozesses ein neues Substrat für die Keratinozytenwanderung bildet. Die Keratinozyten proliferieren und reifen und stellen schließlich die Barrierefunktion des Epithels wieder her (23). Im späteren Stadium dieser Phase werden Fibroblasten, die aus dem Knochenmark oder vom Wundrand aus angelockt werden, durch Makrophagen stimuliert (24). Einige davon differenzieren sich unter Kontrolle von Keratinozyten zu einem besonderen Phänotyp, den Myofibroblasten (25). Dies sind Fibroblasten, die beschädigte extrazelluläre Matrix durch Kollagensekretion reparieren und zudem eine Kontraktion ausüben, die zu einem mechanischen Verschluss der Wunde führt (26).

Die Remodellierung als letztes Stadium der Wundheilung setzt 2-3 Wochen nach der Verletzung ein. In dieser Phase lassen alle zuvor für die Wundheilung aktivierten Vorgänge nach. Viele Endothelzellen, Makrophagen und weitere Zellarten unterliegen nun der Apoptose, dem programmierten Zelltod, oder entfernen sich von der Wunde. So bleibt eine Ansammlung mit weniger Zellen, aber reichlich Kollagen und Proteinen der extrazellulären Matrix, zurück (23, 27). Diese wird dann innerhalb von ca. 6-12 Monaten von einem Typ-III-Kollagen-Gerüst (Granulationsgewebe) zu einem aus Typ-I-Kollagen restrukturiert (28, 29). Metalloproteasen sind dafür zuständig, die extrazelluläre Matrix abzubauen. Dazu werden sie, genau wie deren Inhibitoren, von unterschiedlichen Zelltypen wie Keratinozyten, (Myo-)Fibroblasten, Endothelzellen und auch Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten exprimiert und sezerniert (30). Die induzierte Apoptose der Myofibroblasten ist nun besonders wichtig für die Heilung, da es sonst zu einer hypertrophen Narbenbildung kommen kann (27, 31).

### *2.1.2 Die Rolle der Fibroblasten in der Wundheilung*

Im Folgenden wird genauer auf die Rolle der Fibroblasten bei der Wundheilung eingegangen. Fibroblasten sind spindelförmige Zellen mesenchymalen Ursprungs, welche in vielen Geweben, vor allem im Bindegewebe, zu finden sind (32). Fibroblasten sind sehr heterogene und dynamische Zellen. Fibroblasten unterscheiden sich je nach menschlichem Gewebe und können sich sogar innerhalb eines Gewebetyps unterscheiden (47). Besonders wichtig für die Wundheilung sind die sogenannten Myofibroblasten, ein Phänotyp der Fibroblasten. Diese erhöhen einerseits die Kontraktionskraft durch  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA), andererseits unterscheiden sie sich in Adhäsionskontakten und Zell-Zell-Adhärenzen stark von den in regulärer extrazellulärer Matrix vorkommenden Fibroblasten (33). Entscheidend für die Wundkontraktion und die Migration der Fibroblasten sind  $\alpha$ -SMA und die sogenannten Stressfasern (48). Durch diese kontraktile Kräfte werden die Wundränder zusammengeführt (49).

Fibroblasten sind in einer normal heilenden Wunde vor allem ab der späten Inflammationsphase bis zum Ende der Epithelialisierung aktiv. Am Ende der Inflammationsphase, ca. 24-48 h nach der Verletzung, treffen die ersten Fibroblasten an der Stelle der Verletzung ein (33, 34). Normalerweise sind sie im unverletzten Gewebe zu finden, wo sie primär für den Aufbau und den Umsatz der extrazellulären Matrix im Bindegewebe zuständig sind (34, 35). Chemoattraktoren wie *Plateled-*

*derived growth factor* (PDGF), Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) werden von Blutplättchen und Makrophagen produziert oder aus der provisorischen Matrix freigesetzt. Durch diese Chemoattraktoren gelangen die Fibroblasten zur Wundstelle (36). Sie haften über Integrine mit fokalen Kontakten an das Fibringerinnsel und das Wundbett an (37). Im Wundbett beginnen die Fibroblasten zu proliferieren und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und andere Proteine zu produzieren. Somit können sie denaturierte Proteine und weiteres Material beseitigen, welches im Sinne der Wundheilung nicht mehr benötigt wird. Diese MMPs werden von entsprechenden Inhibitoren wie etwa den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) kontrolliert (38), die ebenfalls von Fibroblasten hergestellt werden (39). Außerdem produzieren Fibroblasten neue extrazelluläre Matrix. Diese ist anfangs reich an Kollagen III, Fibronectin und Hyaluronsäure (40).

Reguliert wird die Aktivität der Fibroblasten im verletzten Gewebe durch die bereits genannten Faktoren Interleukin-1, TNF- $\alpha$  sowie durch *transforming growth factor*  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) und Angiotensin II. Myofibroblasten können dabei sogar selbst TGF- $\beta$ 1 aus der extrazellulären Matrix bilden (41-43). Fibroblasten können außerdem auf mechanische Veränderungen in der extrazellulären Matrix reagieren (41, 44).

Wenn im Kontext der Wundheilung zu wenige Fibroblasten vorhanden sind, kann dies zu weniger Granulationsgewebe führen und in einer gestörten Wundheilung resultieren. Liegt hingegen eine zu hohe Fibroblastenaktivität vor, kann dies zu einer hypertrophen Narbe, Keloidbildung oder Kontrakturen des Gewebes führen (45). Durch die Ablagerung von extrazellulärer Matrix, den Abbau des Fibringerinnsels und die Wundkontraktion sind Fibroblasten in der Lage, die Mikroumgebung der Wunde von einem entzündlichen Zustand in einen Wachstumszustand zu überführen (34).

Somit sind die Viabilität, Aktivität und Migration der Fibroblasten neben einer pro- und antiinflammatorischen Balance ausgesprochen wichtig für den Wundheilungsprozess in der Haut wie auch in der oralen Schleimhaut.

### *2.1.3 Besonderheiten der oralen Wundheilung und Wundheilungsstörungen*

In der Mundhöhle ist die Wundheilung gesondert zu betrachten, da bei dieser einige Unterschiede zur dermalen Wundheilung vorliegen. Dazu zählt das besondere orale Mikromilieu, welche sich von der Dermis unterscheidet. Die Mundhöhle ist von Millionen von Mikroorganismen besiedelt (3) und mit Speichel benetzt. Im Gegensatz zu Wunden auf der Haut entstehen im Mund wenige bis keine Narben (46-48) und das

Epithel der Mundschleimhaut ist dicker als das der Haut. Außerdem findet sich hier eine höhere Zellproliferationsrate (49, 50). Die Entzündungsphase beginnt im Mund zudem früher, da es weniger Faktoren gibt, die die Immunantwort beeinflussen. Weniger Blutgefäße und mehr Zellen aus dem Knochenmark sind beteiligt. Die Reepithelisierung, sowie auch die Fibroblasten-Proliferation sind in der Mundhöhle schneller (3, 46, 51). Darüber hinaus scheint eine ausgeglichene Entzündungsreaktion auch eine entscheidende Rolle für eine optimale Wundheilung der Mundschleimhaut im speziellen zu spielen (49, 52). Auch der Speichel könnte teilweise dafür verantwortlich sein, dass die Immunreaktion geringer ausfällt (46). Dass die orale Wundheilung besser ist als die dermale, könnte evolutionär bedingt sein, da die Aufnahme von Nahrung lebensnotwendig ist (53).

Doch auch in der Mundhöhle kann es zu einer gestörten Wundheilung kommen. Die Faktoren, die dazu führen können, sind zahlreich und zum Teil noch nicht hinreichend erforscht. Einige sollen hier kurz erläutert werden. Etwa führte eine gestörte Blutgerinnung in Experimenten auch zu einer verzögerten Wundheilung (54). Auch nach der Entstehung einer Mund-Antrum-Verbindung, beispielsweise nach der Extraktion eines Oberkiefer-Molaren, kann die Wundheilung gestört sein (3). Bei einer Infektion kann die Inflammationsphase verlängert werden, was eine gestörte und verzögerte Wundheilung zur Folge hat. Dabei kann eine Wunde zu einer chronischen Wunde werden (55). Ein Fremdkörper *in situ* kann ebenfalls zu chronischen Wundinfektionen führen. Typisch hierfür sind in der Zahnmedizin beispielsweise Guttapercha oder Zement nach einer Wurzelkanalbehandlung, welche im Knochen zurückbleiben. Außerdem kann ein Teil der Zahnwurzel, eine *radix relicta*, oder auch andere Zahnfragmente oder Sequester für eine solche Infektion verantwortlich sein (3).

Häufig iatrogen eingesetzte Fremdkörper in der Zahnmedizin sind beispielsweise dentale Implantate. Diese Eingriffe stellen die orale Wundheilung vor eine besondere Herausforderung. Die Weichgewebsheilung um dentale Implantate ist ein komplexer, biologischer Prozess und spielt nicht nur eine Rolle für die Ästhetik des Implantates, sondern bildet auch die Basis für eine stabile Osseointegration und somit ein langzeitstabiles Ergebnis (2). Die periimplantäre Mukositis bezeichnet einen entzündlichen, reversiblen Zustand des Weichgewebes um das Implantat herum. Sie wird als Vorstufe der Periimplantitis angenommen, weshalb man bereits früh mit der Behandlung starten sollte (56). Die Gesundheit des periimplantären Gewebes geht

also mit dem Implantaterfolg einher, was eine Herausforderung darstellt (57). Der Begriff Periimplantitis bezieht sich auf eine Erkrankung des Gewebes um ein Implantat, die zu Entzündung und Knochenverlust führt (58, 59). Laut einer Metaanalyse sollen ca. 20% aller Patienten mit Implantaten von Periimplantitis betroffen sein (60).

Die Gingivitis bezeichnet eine entzündliche, reversible Erkrankung der Gingiva. Ausgelöst wird die Erkrankung durch den Biofilm auf den Zähnen, insbesondere wenn sich dieser zervikal, am Zahnhals, akkumuliert. Mit der Entfernung des Biofilms kann auch die Gingivitis wieder abklingen (61). Daher ist die wichtigste Therapie für dieses Krankheitsbild die Entfernung des Biofilms (62). Bleibt eine Gingivitis unbehandelt, so kann diese zu Parodontitis führen (63). Die Parodontitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, welche irreversibel ist (64). Dabei geht das Bindegewebe und Kollagen der Gingiva verloren, zusätzlich kann es zu einer Knochenresorption kommen. Die Parodontitis hat auch systemische Auswirkungen, da eine lokale Entzündung vorliegt, welche sich durch die Ausschüttung inflammatorischer Moleküle in den Organismus auch negativ auf andere Organe auswirken kann (65). *Porphyromonas gingivalis* ist ein anaerobes, gramnegatives Bakterium, ein häufiger Pathobiont der oralen Mikrobiota und mit der Entstehung einer Parodontitis assoziiert. Es ist in der Lage, das orale Epithel zu besiedeln und steht in engem Zusammenhang mit Parodontitis, kann aber auch bei Patienten ohne Parodontitis im Wirtsepithel existieren (66). Es ist bekannt, dass *P. gingivalis* die Zellmigration durch die Herunterregulierung von Integrin  $\beta$ -3 und -6 beeinträchtigt (67), und es wurde festgestellt, dass seine Kapselpolysaccharide und Virulenzfaktoren wie Gingipaine die Wundheilung behindern (68, 69).

#### 2.1.4 Begünstigende Faktoren für das Auftreten von Wundheilungsstörungen

Bei der oralen Wundheilung kann es demnach zahlreiche Probleme geben. Klinisch äußern sich Wundheilungsproblematiken in Form von z.B. Wunddehiszenzen, Granulombildung, Ulzera, Eiterbildung oder der Bildung von Granulationsgewebe (3). Verschiedene Faktoren können dieses Geschehen beeinflussen. Das Patientenalter scheint eine relevante Einflussgröße zu sein, jedoch konnten Studien zeigen, dass das Alter eines Patienten zwar die Dauer der Wundheilung verzögert, jedoch nicht das Resultat beeinflusst (70). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Wunddehiszenzen unabhängig vom Alter der Patienten auftraten (71). Demnach birgt ein hohes Alter nicht generell die Gefahr, eine Wundheilungsstörung zu entwickeln.

Adipositas hingegen kann die Wundheilung generell negativ beeinflussen. Patienten mit Adipositas weisen zum Beispiel extraoral ein höheres Risiko für Hämatome auf, sowie ein häufigeres Auftreten von Dehiszenzen, da die Spannung der Wundränder höher ist (72). Das Auftreten von Adipositas erhöht zusätzlich das Risiko einer *Diabetes mellitus* Typ 2-Erkrankung (73, 74). Bei *Diabetes mellitus*-Patienten tritt ebenfalls eine Wundheilungsproblematik auf, denn aus einer hohen Glukosekonzentration resultiert auch eine erhöhte Sorbitolkonzentration im Gewebe, ein giftiges Nebenprodukt der Glukose. Perikapilläre Albuminansammlungen durch erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße bei Diabetikern verhindern, dass Sauerstoff und Nährstoffe richtig transportiert werden können (75). Auch eine Makrophagendysfunktion und damit eine gestörte Kollagensynthese lagen bei diesen Patienten vor (76). In einer Metaanalyse von 53 Studien konnte ein klarer, bidirektionaler Zusammenhang zwischen Parodontitis und *Diabetes mellitus* Typ 2 hergestellt werden (77). In einer weiteren Studie wurde auch eine Verbindung von Parodontitis und Diabetes Typ 1 und Typ 2 festgestellt (78). Und auch mit einem erhöhten Zahnverlust konnte Diabetes bereits in Verbindung gebracht werden (79).

Des Weiteren können sich Erbkrankheiten wie *Osteogenesis imperfecta* oder *Epidermolysis bullosa* negativ auf die Wundheilung auswirken (3). Auch medikamenteninduzierte Wundheilungsstörungen können auftreten. Besonders sind hier Bisphosphonate und *Biologicals* wie Denosumab hervorzuheben. Dabei kann es beispielsweise zu Nekrosen des Unterkiefers oder Fistelbildung kommen (3).

Menschen, die an einem Vitamin A-Mangel leiden und dieses supplementieren müssen, können ebenfalls an Wundheilungsstörungen leiden. Durch Vitamin A-Mangel werden die Makrophagen gehemmt, welche für den Prozess der Wundheilung unabdingbar sind. Dadurch wird weniger Kollagen synthetisiert und somit wird die Wundheilung verlangsamt und erschwert (3). Kortikosteroide haben einen ähnlichen Effekt, indem sie auch die Makrophagen hemmen. Jedoch konnte hier keine verschlechterte Wundheilung im Zusammenhang mit Kortikosteroiden festgestellt werden, lediglich bei systemischen Steroiden könnte es zu einer Verschlechterung kommen (80).

Durch Alkoholabusus wird durch entstehendes Acetaldehyd und Sauerstoffradikale Gewebe zerstört, was die gesamte Wundheilung behindert (81). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Rauchen die Wundheilung beeinträchtigt (55, 82).

Tumorpatienten mit Chemotherapie und/oder Strahlentherapie haben auch ein höheres Risiko, an einer Wundheilungsstörung zu leiden. Während der Chemotherapie ist die Wundheilung gestört, da weniger Thrombozyten und Leukozyten vorhanden sind (83, 84). Bei einer Bestrahlung besteht ab 50 Gray ein hohes Risiko für die Entwicklung von Wundheilungsstörungen, vor allem im Bereich der Molaren des Unterkiefers (85). Normalerweise ist der Pilz *Candida albicans* ein Kommensale der oralen Schleimhaut (86). Kommt es beispielsweise im Rahmen einer Chemotherapie zu einer Immunsuppression, so führt dies zu einer bakteriellen Dysbiose, welche das überschießende Wachstum von *C. albicans* verstärkt. Dies fördert Infektionen der Schleimhaut (87).

In der Mundhöhle gibt es folglich verschiedene Arten von Wundheilungsstörungen und diverse Faktoren, die diese begünstigen. Außerdem können zahlreiche Pathobionten oder Bakterien zu einer insuffizienten Wundheilung beitragen (3). Dazu gehört auch *Staphylococcus aureus* (88). Befindet sich *S. aureus* in einem Biofilm, so führt dies zu einer verschlechterten Wundheilung durch die Veränderung des Kollagens (89).

Im klinischen Kontext wirken sich Wundheilungsstörungen negativ auf die Gesundheit und Lebensqualität der Patienten aus. Oraler Lichen planus (OLP) und orale Mukositis sind Beispiele für solche klinischen Krankheitsbilder, bei denen wiederkehrend Läsionen in der oralen Mukosa auftreten können. Diese Formen von Läsionen könnten von einer verbesserten Wundheilung durch beispielsweise topische Präparate profitieren. Die orale Mukositis bzw. Stomatitis ist eine entzündliche Erkrankung der Mundschleimhaut. OLP, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Mundschleimhaut, betrifft etwa 2% der erwachsenen Bevölkerung und erhöht das Risiko für bösartige Veränderungen und die Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms (90-93). Patienten mit OLP leiden häufig unter einem brennenden Gefühl oder Schmerzen, insbesondere bei erosiven Schleimhautläsionen.

### 2.1.1 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Bewährt hat sich in der Zahnmedizin insbesondere der Einsatz von Antiseptika zur begleitenden Therapie von oralen Wundheilungsstörungen, um die Bakterienlast zu reduzieren. Besonders in der Parodontologie bewährte sich dafür eine Mundspüllösung oder ein Gel mit Chlorhexidin. Dieser Wirkstoff wirkt zwar antibakteriell, birgt jedoch zahlreiche Nebenwirkungen wie Verfärbungen der Zähne (94) und zytotoxische Eigenschaften gegenüber humanen Zellen (6). Daher ist

Chlorhexidin auch für die Periimplantitis-Therapie nicht optimal geeignet (95). Ein Gel mit dem Wirkstoff Lidocain konnte in der Parodontitis-Therapie zwar Schmerzen lindern, jedoch nicht die Wundheilung verbessern (96).

Bei der Behandlung von Parodontitis kommt wie auch anderen bakteriell bedingten Erkrankungen auch eine systemische Antibiose als Therapie in Frage (97). Doch Antibiotika haben maßgebliche Nachteile. Schon der Entdecker des Penicillins, Alexander Fleming, warnte davor, dass Bakterien Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln könnten (98). Auch gastrointestinale Beschwerden wie Antibiotikum-assoziiertes Durchfall sind als Nebenwirkung keine Seltenheit (99). Eine sorgfältige Risiko-Nutzen Analyse ist aus diesen Gründen vor einer systemischen Antibiotikatherapie zwingend empfohlen.

Glucocorticoide finden im oralen Bereich ebenfalls Anwendung. In einer Studie mit Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)-Patienten konnte eine positiv heilende Wirkung von einer Paste mit dem Wirkstoff Prednisolon-Acetat nach Zahnextraktionen festgestellt werden (100). Prednisolon ist ein Glucocorticoid, welches auch in der topischen Anwendung Nebenwirkungen aufweist: dabei kommt es beispielsweise zu Haut-Atrophien (101). Die Nebenwirkungen bei oraler Anwendung scheinen jedoch noch nicht ausreichend erforscht zu sein. Auch Betamethason gehört zur Gruppe der Glucocorticoide. Es wird in der Therapie von OLP angewandt und erzielt dabei gute Ergebnisse (102). Allerdings können Nebenwirkungen auch hier nicht ausgeschlossen werden (103).

Darüber hinaus wurden bereits weitere topische Präparate auf der oralen Mukosa untersucht. Die topische Anwendung von Benzzydamin wird bei oraler Mukositis während einer Radio- oder Radiochemotherapie eingesetzt. Dabei konnten verschiedene Studien belegen, dass die Mukositis sich mit der Anwendung des Benzzydamin signifikant verbesserte (104-108). Allerdings wirkte Benzzydamin nur nach Radiotherapie, nicht nach Chemotherapie und ist damit nicht universal bei Wundheilungsstörungen anwendbar (109). Ein topisches Präparat, das Dexpanthenol und Silbiol enthält, zeigte in einem Rattenmodell keine positive Wirkung auf die Wundheilung der Schleimhaut (110). Ein adhäsives Gel mit 10% Anthocyanin konnte die orale Wundheilung bei Ratten mit oralen Schnittwunden beschleunigen (111).

Die derzeitigen Therapien für die orale Wundheilung bieten allerdings noch keine ausreichend wirksamen Behandlungsergebnisse (112). Die aktuell verfügbaren

topischen sowie systemischen Behandlungen haben eine limitierte Effektivität und gehen zudem teilweise mit unerwünschten Nebenwirkungen einher.

## 2.2 Pflanzenextrakte aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel

### 2.2.1 *Aloe vera*

*Aloe vera*, auch *Aloe barbadensis* Miller, ist eine Pflanze, welche vor allem in heißen, trockenen Gebieten wächst. Ihr Gel aus dem Inneren der Blätter wird als traditionelle Heilpflanze beispielsweise bei Verbrennungen oder Wunden eingesetzt und ist weit verbreitet (9). Die topische Anwendung von *Aloe vera* konnte im Tiermodell mit Ratten dermal eine verbesserte Wundheilung erzielen. Dabei konnte *Aloe vera* sogar den negativen Effekt von Mafenidacetat, einem topischen Antiseptikum, ausbalancieren (113). In einer klinischen Studie wurden Patienten mittels Dermabrasion, einem Abschleifen der Haut, behandelt. Die Patienten, welche anschließend mit *Aloe vera* behandelt wurden, wiesen eine deutlich schnellere Wundheilung auf (114). In einem Mausmodell wirkte *Aloe barbadensis* antiinflammatorisch und erzielte ohne Nebenwirkungen den gleichen Effekt wie Hydrocortison (115). Zugefügte Wunden heilten in einem weiteren Kleintiermodell unter der Zugabe von *Aloe vera* schneller. Eine Verbesserung der Angiogenese, sowie des Kollagengehaltes konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine PCR ergab, dass auch die Expression von Genen für Chemotaxis erhöht waren (116).

In einem weiteren Rattenmodell konnte bewiesen werden, dass *Aloe vera*-Extrakt bei Haut-Verbrennungen durch eine *Radiatio* hilfreich war (117). Auch die Speichelflussrate der Ratten wurde während einer *Radiatio* durch *Aloe vera* erhöht. Daraus kann eine radioprotektive Wirkung geschlossen werden (118). Oral verabreicht fungierte *Aloe vera* bei Mäusen bereits radioprotektiv (119). In einer anderen Studie hingegen zeigten weder Dexpanthenol noch *Aloe vera* allein ein prophylaktisches Potenzial für eine orale Mukositis bei Mäusen, die einer einmaligen Schleimhautbestrahlung ausgesetzt wurden (120).

Bei einer Mukositis unter *Radiatio* im Kopf-Hals-Bereich konnte eine *Aloe vera*-Mundspülung einen ebenso wirksamen Erfolg erzielen wie eine Benzylamin-Mundspüllösung. Bei *Aloe vera* traten dabei keinerlei Nebenwirkungen auf (121). Auch bei einer Stomatitis als Nebenwirkung einer Chemotherapie bei Lymphomen oder einer Leukämie wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: die Patientenzufriedenheit stieg

mit der Behandlung an, da sie weniger Schmerzen verspürten und die Stomatitis weniger intensiv auftrat (122).

Auch weitere Erkrankungen in der Mundhöhle könnten von dem Pflanzenextrakt profitieren. Bei der Therapie der oralen submukösen Fibrose konnte *Aloe vera* ebenso positive Effekte zeigen (123, 124). Topische *Aloe vera*-Anwendung erzielte einen erfolgversprechenden Effekt in der Therapie von OLP (125).

Ein Grund für die Entstehung zahlreicher Krankheiten in der Mundhöhle ist die Bildung von Biofilm durch Mikroorganismen. Dieser Biofilm kann u.a. eine Gingivitis, eine Zahnfleischentzündung, verursachen. In verschiedenen klinischen Studien stellte sich heraus, dass *Aloe vera* ebenso stark biofilmreduzierend wirkte wie Chlorhexidin (126, 127). Bei *Aloe vera* traten im Gegensatz zur zytotoxischen Wirkung von Chlorhexidin (6) keinerlei Nebenwirkungen auf (127). In einer anderen Studie, bei der Biofilm- und Gingiva-Scores gemessen wurden, wies Chlorhexidin jedoch eine signifikant höhere Reduktion dieser Werte auf als *Aloe vera* (128). In weiteren klinischen Studien konnte *Aloe vera* zwar das Ergebnis, z.B. das *clinical attachment level*, gegenüber der Kontrollgruppe verbessern, jedoch schnitten Alendronat und Metformin mit einer jeweils 1%igen Konzentration trotzdem signifikant besser ab (129, 130). Aus der Literatur lässt sich schließen, dass *Aloe vera* bei einer Gingivitis eine unterstützende Wirkung zeigen kann.

Schreitet die Gingivitis unbehandelt weiter fort kann dies zur Entwicklung einer Parodontitis führen. In der Parodontitistherapie bei Typ-2-Diabetikern konnte *Aloe vera*, gemessen an verschiedenen Parodontitis-Indizes, eine signifikante Verbesserung erzielen als die Kontrollgruppe, welche mit einem Placebo-Gel behandelt wurde (131). Und auch bei Patienten ohne *Diabetes mellitus* konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden, indem durch *Aloe vera* beispielweise die Taschentiefe reduziert werden konnte (132).

Doch nicht nur der Zahnhalteapparat, auch die Zähne selbst können von den Vorteilen *Aloe veras* profitieren. Eine Anwendung bei Zahntraumata wäre denkbar, da z.B. 50%iges *Aloe vera*-Gel die Zellviabilität von dentalen Pulpa-Stammzellen erhöht (133). Auch für den Zahnschmelz scheint *Aloe vera* positive Effekte zu haben: In einer *in vitro*-Studie konnte nachgewiesen werden, dass *Aloe vera* zusammen mit Fluorid die Remineralisation verstärkte (134). Nach einer atraumatischen Zahnextraktion konnten *Aloe vera*-Gel-getränkte Schwämme in der Alveole eine verbesserte Wundheilung ohne Nebenwirkungen erzielen, im Gegensatz zu herkömmlichen Analgetika (135).

Auch für die Therapie einer oralen Candidose, ausgelöst durch *Candida albicans*, ist *Aloe vera* denkbar. In einem Versuch mit vaginaler Candidose konnte *Aloe vera* den Pilz inhibieren und dabei sogar einen vergleichbaren, antifungalen Effekt wie Standard-Therapeutika erzielen (136). Auch *in vitro* konnte die Hemmung von *C. albicans* durch *Aloe vera* bestätigt werden (137, 138). *In vivo*-Versuche, bei denen *Aloe vera* in der Mundhöhle auf *C. albicans* angewendet wurde, sind bisher nicht in der Literatur zu finden.

*Aloe vera* weist eine antibakterielle Aktivität gegen verschiedene Bakterien auf, wie beispielsweise *S. aureus* und *S. pyogenes* (138) oder Methicillin-resistenter *S. aureus* (139). Außerdem konnte eine dosisabhängige antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* und *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Clostridium bacilli* nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um orale Pathogene, welche besonders mit *Aloe vera*-Konzentrationen von 50% und 100% gehemmt wurden (140). Bei der Desinfektion einer Karies-Kavität wirkte *Aloe vera* desinfizierend, die Anzahl der Bakterien wurde reduziert (141). Eine Hemmung des Karies-Bakteriums *S. mutans* konnte ebenfalls nachgewiesen werden (142).

*Aloe vera* allein wies in Versuchen der AG keine antimikrobielle Aktivität gegen *P. gingivalis* auf (143). In der Literatur wird die antibakterielle Wirkung von *Aloe vera* mitunter als dosisabhängig beschrieben, wobei in einer Studie von Jain *et al.* keine absolute Konzentration des *Aloe vera*-Gels angegeben werden konnte, da *Aloe vera*-Gel aus der frischen *Aloe vera*-Pflanze hergestellt wurde (144). In einer anderen Untersuchung wurde eine minimale Hemmkonzentration von *Aloe vera* mit Werten von 50 mg/l für den *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33227 beschrieben (142) die innerhalb der AG nicht reproduziert werden konnten.

Verschiedene *in vivo* und *in vitro*-Studien deuteten bereits eine verbesserte Wundheilung an. *Aloe vera* zeigte sich stimulierend auf die Proliferation und Migration von Fibroblasten (144) und Keratinozyten (145). In einem *in vivo*-Versuchsmodell mit Hühnereiern, dem *Chorioallantoismembran-Assay*, wurde eine Stimulation der Angiogenese durch Dichlormethan aus der *Aloe vera*-Pflanze beobachtet (146).

Bisher ist unklar, welche Substanzen in *Aloe Vera* die aufgezählten Wirkungen erzielen, hierzu existieren aber Hypothesen. Einige der positiven Auswirkungen von *Aloe vera*, wie beispielsweise der antiinflammatorische Effekt, werden aufgrund der enthaltenen Polysaccharide vermutet. Allerdings ist dieser Sachverhalt wegen unterschiedlicher Zusammensetzungen, Herkunft etc. der Pflanzen noch nicht

vollständig erforscht (147). Eines der vorhandenen Polysaccharide in *Aloe vera* ist Acemannan (148). *Aloe vera* beinhaltet zusätzlich Anthrachinone wie Emodin, Aloe-Emodin und Aloin (138, 149, 150). Aloe-Emodin aus *Aloe vera* konnte beispielsweise für eine verbesserte Wundheilung nach Verbrennungswunden bei Mäusen sorgen (151).

Generell zeigen die zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien, dass *Aloe vera* aufgrund der positiven Eigenschaften eine vielversprechende Heilpflanze in den verschiedenen genannten Bereichen ist (9).

### 2.2.2 Rhabarberwurzelextrakt

Die Blattstiele der Rhabarberpflanze werden als Lebensmittel verwendet. Die Wurzeln der Rhabarberpflanze können getrocknet und in der Medizin als Tonikum oder Abführmittel verwendet werden (152). In der traditionellen chinesischen Medizin ist die Pflanze als *Dahuang* bekannt (153). Rhabarberwurzelextrakt unterscheidet sich je nach Spezies, aus der er gewonnen wird. Dabei ist wichtig, diese zu unterscheiden, da sich beispielsweise *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* und *Rheum tanguticum* in den in ihnen enthaltenen Verbindungen unterscheiden (154, 155). Für die Versuche im Rahmen dieser Dissertation wurde ausschließlich die Spezies *Rheum palmatum* verwendet, welche in China vorkommt (155). In diesem Kapitel wird auf die antibakterielle Wirkung von Rhabarberwurzel, die Wirkung auf *Diabetes mellitus* im Zusammenhang mit Parodontitis, sowie auf Eigenschaften des Inhaltsstoffes Emodin eingegangen. Dieser kommt laut einer Studie von Wang *et al.* in *Rheum palmatum* vor (156).

Eine antibakterielle Wirkung gegen das Bakterium *P. gingivalis* konnte bereits nachgewiesen werden (10-12, 157). Es konnte gezeigt werden, dass der Extrakt bei 3,9 mg/l beginnt, das planktonische Wachstum von *P. gingivalis* zu hemmen (10). Diese antimikrobielle Wirkung könnte zum Teil auf das Vorhandensein von Anthrachinonen, insbesondere des Anthrachinons Rhein, zurückzuführen sein (10, 11). Auch die Anthrachinone Emodin und Aloe-Emodin kommen in dieser Pflanze vor (156). Emodin wirkte auch bereits antibakteriell gegen *S. aureus* in Biofilmen (158). Zusätzlich konnte Emodin, welches aus den Wurzeln von anderen Pflanzen gewonnen wurde, *S. mutans* (159) und damit die Kariesentwicklung bei Ratten hemmen (160). In einem weiteren Kleintiermodell konnte die Anwendung von Aloe-Emodin die Knochenresorption und Taschentiefe bei Parodontitis-Patienten verringern (161). Eine

verbesserte orale Wundheilung wurde vermutet, da Rhabarberwurzelextrakt bei epithelialen Zellen die Zellproliferation steigerte (11).

Rhabarberwurzelextrakt konnte auch bereits bei Patienten, die unter *Diabetes mellitus* litten, eine heilende Wirkung in der Parodontitis-Therapie erzielen: die Taschentiefe, das *clinical attachment level*, sowie die Blutung auf Sondierung wurden verbessert (162). Außerdem wurde nachgewiesen, dass mithilfe eines Öls, welches aus Rhabarberwurzel gewonnen wurde, der Blutzucker bei *Diabetes mellitus* Typ 2-Patienten gesenkt und damit die Grunderkrankung verbessert werden konnte (163). In einer weiteren Studie wurde *Diabetes mellitus* mithilfe von Rhein, welches aus *Rheum palmatum* gewonnen wurde, verbessert. Dabei wirkte es entzündungshemmend, verhinderte oxidativen Stress und der Glukose- und Lipidstoffwechsel wurden verbessert (164). Auch Emodin könnte die Wundheilung bei diabetischen Wunden verbessern, was in einem Mausmodell auf eine erhöhte Fibroblastenproliferation sowie erhöhte Expression von Kollagen Typ III, Fibronectin und  $\alpha$ -SMA zurückgeführt werden konnte (165).

Emodin konnte in Ratten- bzw. Mausmodellen antiinflammatorische Eigenschaften zeigen und sogar Schmerzen lindern (166, 167). Auch in anderen Bereichen besteht ein hohes therapeutisches Potenzial dieser Substanz: Antitumorale Eigenschaften von Emodin mit einer Wirksamkeit gegen Tumore in verschiedenen Körperregionen konnten durch zahlreiche Studien bereits nachgewiesen werden (168-173). Auch Aloe-Emodin birgt Potenzial für die Brustkrebs-Behandlung (168). Emodin aus *Rheum palmatum* zeigt zudem eine antivirale Wirkung (174). Eine Kombination aus Rhabarberwurzel und Salbei konnte außerdem gute Ergebnisse bei einer Herpes-Erkrankung erzielen (175). Allerdings wurde auch eine Nephro- und Hepatotoxizität diskutiert (156, 176).

### 2.2.3 Kombination von *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt

In der Arbeitsgruppe (AG) von \_\_\_\_\_ wurde die Kombination der Pflanzenextrakte *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt bereits hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung analysiert. Innerhalb der AG wurden die beiden Pflanzenextrakte erstmals kombiniert untersucht. Hier sank die minimale Hemmkonzentration mittels Mikrodilution von 4 mg/l bei alleiniger Verwendung von Rhabarberwurzelextrakt auf 2 mg/l bei der Verwendung der Kombination aus Rhabarberwurzelextrakt und *Aloe vera* (143). Diese Tatsache spricht für einen

synergistischen Effekt der Pflanzenextrakte, da eine geringere minimale Hemmkonzentration für eine verbesserte antimikrobielle Aktivität steht. Aufgrund der antibakteriellen Wirkung von Rhabarberwurzelextrakt und der wundheilungsfördernden Eigenschaften von *Aloe vera* wurden die beiden Pflanzenextrakte für diese Dissertation ausgewählt und in Verbindung mit den für die Wundheilung wichtigen Fibroblasten erforscht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

In Tabelle 1 werden alle verwendeten Chemikalien inklusive des Herstellers aufgelistet. In Tabelle 2 ist die genaue Zusammensetzung von verwendeten Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 1: verwendete Chemikalien und deren Hersteller**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Aloe vera</i> Alpha Aloe Konzentrat Pulver <i>Aloe barbadensis</i>	Paninkret, Westerhorn
<i>Aqua destillata (Aqua ad iniectibila)</i>	B. Braun SE, Melsungen
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
BSA Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMEM mit L-Glutamin (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Endopan 3	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Endothelial Cell Growth Basal Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Ethanol ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	PAA, Pasching (Österreich)

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako North America Inc., Carpinteria, CA (USA)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Phalloidin DyLight™ 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Propidium Iodid staining solution (Färbelösung)	Abcam, Cambridge (UK)
Proteaselösung P6141	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Rhabarberwurzel-Trockenextrakt	Paninkret, Westerhorn
RNAse A vom Rinderpankreas	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
sterillium® classic pure	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany
Triton X	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Trypan Blau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Trypsin-EDTA (Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure) 10x	PAA, Pasching (Österreich)
Viability reagent alamarBlue™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

**Tabelle 2: Zusammensetzung gelöster Chemikalien**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Bisbenzimid	Konzentration von 1:5000, gelöst in Wasser und Ethanol zu gleichen Teilen
BSA-T-PBS	0,2% Triton X-100, 1% BSA, in PBS
Phalloidin	300 Einheiten des lyophilisierten DyLight 488-Phalloidin
Propidium Iodid staining solution (Färbelösung)	Propidium Iodid staining solution 0.1% (w/v) RNAse A, 5 µg/ml Propidium Iodid in PBS

### 3.1.1.1 Spezifikation der Pflanzenextrakte aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel

In diesem Kapitel wird genauer auf die verwendeten Pflanzenextrakte eingegangen.

Die folgende Tabelle 3 zeigt die genauen Inhaltstoffe des verwendeten *Aloe vera*-Pulvers vom Hersteller Paninkret.

**Tabelle 3: Bestandteile von AV**

<b>Bestandteile</b>	<b>Anteil im Trockenpulver</b>
Aloverose (Polysaccharid)	14%
Glukose	22,9%
Hydroxybernsteinsäure	20,9%
Milchsäure	0,1%
Citronensäure	1%
<i>Whole leaf marker</i>	Spuren
Fruktose	Festgestellt
Magnesium	0,7%
Calcium	2%
Maltodextrin	Nicht festgestellt
Essigsäure	Festgestellt
Bernsteinsäure	Nicht festgestellt
Fumarsäure	Nicht festgestellt
Sodium Benzoate	Nicht festgestellt
Kaliumsorbat	Nicht festgestellt
Andere	Festgestellt
Aloin	Ausstehend
Aloe-Emodin	Nicht ermittelt

Für Aloin und Aloe-Emodin liegt die Bestimmungsgrenze laut Hersteller bei 0,1 *parts per million* (ppm).

Für den Rhabarberwurzel-Trockenextrakt aus *Rheum palmatum* wurde vom Hersteller keine genaue Angabe bezüglich der Inhaltsstoffe gemacht. Bei einer HPLC-Analyse durch Müller-Heupt *et al.* konnte ein Rhein-Gehalt von 5 % bestimmt werden. Weitere Bestandteile wurden jedoch nicht spezifiziert (10).

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 zeigt alle in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien inklusive deren Hersteller.

**Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Chamber Slides BD Falcon™ 4 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Glass Slide	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
CryoTubes™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Culture Insert, ibidi® µ-dish, 35mm high	Ibidi GmbH, Gräfelfing
Dreiwegehahn	B. Braun SE, Melsungen
Falconröhrchen: cellstar tubes (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf SE, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf SE, Hamburg
Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen 0,5 – 10 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Pipettenspitzen 10 – 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
96-Well-Platten, schwarz, PS, F-Bottom, µClear, Black	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Cellstar	Greiner Bio-One International, Kremsmünster (Österreich)
Sterile Spitzen 1 ml BD Discardit II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Zellkultur Multiwellplatte, 24 Well, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkulturflaschen, cellstar mit Filterschraubverschluss rot, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.1.3 Geräte

Tabelle 5 zeigt die in der Dissertationsarbeit verwendeten Geräte inklusive deren Hersteller.

**Tabelle 5: verwendete Geräte und deren Hersteller**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Analysewaage Kern ABT 120-5DM	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Brutschrank Thermo Scientific™ Heracell™ 150i CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Incubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CoolCell LX Fläschchenbehälter	Corning, Inc., New York (USA)
Flow cytometer FACSCanto™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Fluoroskan Ascent Mikroplate reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
GFL 1083 Wasserbad GFL 1083	LAUDA DR. R. WOBSEK GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen
Kühlschränke, Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim
Mikroskop Keyence BZ-9000	Keyence Corporation, Ōsaka, prefecture Ōsaka (Japan)
Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokio (Japan)
Orthoplan Leitz	Leitz, Wetzlar
Pipetten	Greiner Bio-One International, Kremsmünster (Österreich)
Pipettierhelfer pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Sterile Werkbank Flow Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexmischer Fisherbrand™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zählkammer Neubauer-improved	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zellschaber	Falcon, Corning, Inc., New York (USA)
Zellsieb EASYstrainer™ 70 µm steril	Greiner Bio-One International, Kremsmünster (Österreich)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1L-R C	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 3.1.4 Software

Die im Rahmen der Dissertationsarbeit verwendete Software inklusive Hersteller wird in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: verwendete Software und deren Hersteller**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
TScratch	Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (Schweiz) ( <a href="http://www.cse-lab.ethz.ch/software.html">www.cse-lab.ethz.ch/software.html</a> )
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Inkscape 1.1	Das Inkscape-Projekt
Ascent Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
BIOREVO BZ-9000	Keyence Corporation, Ōsaka, prefecture Ōsaka (Japan)
BD FACSDiva™ software	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Prism 6.0 for Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien (USA)
NIS Elements D 5.11.00	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokio (Japan)
Microsoft Word Version 16.57	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Excel Version 16.57	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Für die Zellversuche im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurden primäre, humane Fibroblasten verwendet. Diese wurden aus Überschussmaterial humaner Gewebeproben isoliert. Die in dieser Studie verwendeten Gewebeproben wurden durch die Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, unter Einhaltung der ethischen Richtlinien der Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt. Diese Studie wurde in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki über die Verwendung von menschlichem Material für die Forschung durchgeführt. Die Patienten, welche operiert wurden, stimmten der wissenschaftlichen Verwendung überschüssigen Materials zu. In Übereinstimmung mit der rheinland-pfälzischen Ethikkommission war dazu keine weitere Genehmigung nötig, da die Fibroblasten anonym verwendet wurden. Die Proben wurden sofort nach der Entnahme anonymisiert und dann nur als Buchstaben-/Zahlencode verwendet (z.B. FB01/21), wobei die Buchstaben nicht den Initialen der Patienten entsprachen.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Drei verschiedene Größen wurden genutzt:

- große Zellkulturflasche mit einer Kulturfläche von 175 cm<sup>2</sup>
- mittelgroße Zellkulturflasche mit einer Kulturfläche von 75 cm<sup>2</sup>
- kleine Zellkulturflasche mit einer Kulturfläche von 25 cm<sup>2</sup>.

Zellen, die neu aus Gewebe isoliert wurden, wurden zuerst in eine kleine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> gegeben. Die Zellen wuchsen am Boden der Flaschen fest und befanden sich stets in Nährmedium. Dabei handelte es sich bei Fibroblasten um DMEM Zellkulturmedium mit L-Glutamin, welches mit 10 % FCS (fetales Kälberserum) und 2% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Flaschen wurden bei 37 °C in einem Brutschrank aufbewahrt. Das Handling der Zellen erfolgte grundsätzlich an der sterilen Werkbank. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht, das heißt der Boden der Flasche war zu über 70%-80% mit Zellrasen bedeckt, wurden sie in eine größere Flasche umgesetzt. Hierzu wurde das Nährmedium zunächst abgekippt und verworfen. Mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde je nach Zellkulturflasche (klein: 2-3 ml, mittel: 5 ml und groß: 10 ml) einmal gewaschen,

anschließend wurde das PBS zügig abgekippt. Dann wurden die Zellen mittels Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (T/E) vom Boden abgelöst. Für eine kleine Kulturflasche wurden hier ca. 1-2 ml genutzt, für eine mittlere 3 ml und für die große Flasche 5 ml. Nach 4-5 min im Brutschrank hatten sich die Zellen abgelöst. Dieser Vorgang konnte durch leichtes Klopfen an den Boden oder die Seite der Flasche verstärkt werden. Unter dem Mikroskop konnte nun überprüft werden, ob die Zellen abgelöst waren und eine runde, kugelige Form angenommen hatten. Die Reaktion wurde nun mit dem Nährmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt.

Von dieser Zellsuspension wurden 30 µl entnommen, um die Zellzahl zu ermitteln, wie in 3.2.2. beschrieben. Die restliche Zellsuspension wurde bei 1500 *revolutions per minute* (rpm) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand über dem Zell-Pellet abgekippt und verworfen. Das Pellet wurde mit frischem Nährmedium gründlich resuspendiert und je nach Verwendung entweder neu ausgesät oder für einen Versuch genutzt. Bei jedem dieser Vorgänge wurde die Passage der Zellen erhöht. Wurden die Zellen, z.B. Fibroblasten direkt aus einer Gewebeprobe isoliert, hatten sie Passage null, beim nächsten Umsetzen Passage eins usw. Alle primären Zellen wurden nicht über Passage zehn hinaus genutzt. Für eine gute Übersicht wurde jede Zellkulturflasche stets mit Initialen des Forschenden, Zellnamen und Passage und Datum versehen. Zudem wurde alle 2-3 Tage das Nährmedium gewechselt. Für die genannten Pipettiervorgänge wurde stets eine Pipetus-Pipettierhilfe und die dazu passenden Stabpipetten benutzt. Die Vorgänge wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt.

### 3.2.2 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dafür wurden 30 µl Zell-Nährmedium-Gemisch mit 30 µl Trypan-Blau gemischt. Dieses sorgt dafür, dass tote Zellen blau angefärbt und somit nicht mitgezählt werden. In einer 96-Well-Platte oder einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde durch Resuspendieren gemischt. 10 µl der Mixtur wurden auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Mithilfe eines Mikroskops konnten die Zellen in vier Quadranten mit je 4x4 Quadranten gezählt werden. Die Gesamtzellzahl errechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl Quadranten}} \times 2 \times \text{Volumen in ml} \times 10.000$$

### 3.2.3 Isolation von Fibroblasten aus Gewebeproben

Der Vorgang des Isolierens von Fibroblasten aus der Nasenschleimhaut der Nasenmuschel orientierte sich am Protokoll von [Name], wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG [Name] der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz.

Die Gewebeprobe wurde zunächst mithilfe eines sterilen Skalpells in ca. 2 mm kleine Fragmente zerteilt. Die einzelnen Stücke wurden in Ethanol, Sterillium und wieder Ethanol getaucht, um sie zu reinigen. Die Gewebestücke wurden anschließend über Nacht in einer Protease-Lösung im Kühlschrank inkubiert. Dafür wurden 0,25 g Protease P6141 in 50 ml PBS gelöst (oder weniger im selben Verhältnis). Nach ca. 24 h wurde die Probe aus dem Kühlschrank entnommen und zunächst für 15 min auf ein 37°C warmes Rüttelgerät gestellt. Anschließend wurde die Probe unter mehrfachem Spülen mit PBS durch ein Zellsieb in ein neues Falcon gepresst. Nach mehrmaligem Wiederholen dieses Vorgangs konnte das neue Röhrchen zentrifugiert werden, 5 min bei 1500 rpm. Der Überstand über dem Zellpellet wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturschale ausgesät. Anfangs wurde das Medium täglich gewechselt, anschließend alle 2-3 Tage. Bei einer vollen Schale wurden die Zellen, wie oben beschrieben, auf eine mittelgroße Zellkulturschale umgesetzt. Damit erreichen die Zellen dann die Passage 1 (P1).

### 3.2.4 Kryokonservierung der Zellen

Um Zellen zu einem späteren Zeitpunkt weiter verwenden zu können wurden Zellen eingefroren. Zunächst wurde FCS aufgetaut und mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Wie in 3.2.1 beschrieben, wurde die Schale mit PBS gespült und danach die Zellen mit T/E von der Zellkulturschale abgelöst. Nach dem Zentrifugieren, für 5 min bei 1500 rpm, konnte das Pellet in die FCS-DMSO-Mischung aufgenommen werden. Bei einer großen Zellkulturschale wurden stets 3 Kryoröhrchen verwendet. Dafür wurde das Zellpellet in 4,5 ml der Mischung aufgenommen und auf die Kryoröhrchen verteilt: 1,5 ml pro Röhrchen. Nach Beschriftung mit Initialen, Datum, Zellnamen und Passage wurden die Röhrchen zunächst in eine *Cool/Cell* Einfrierhilfe gegeben. Diese kühlt die Zellen um -1°C pro Stunde im -80°C kalten Gefrierschrank. Später konnten die Zellen dann in einen Stickstofftank überführt werden.

### 3.2.5 Auftauen der Zellen

Zur erneuten Benutzung der Zellen wurden diese zunächst aus dem Gefrierschrank oder Stickstofftank entnommen. Anschließend wurde das Kryoröhrchen mithilfe von Handwärme aufgetaut. Sobald die Mischung flüssig war, wurde diese in ein Falcon mit 5 ml Nährmedium pipettiert. Dieses wurde zunächst 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte das Zellpellet in 5 ml Nährmedium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche ausgesät werden.

### 3.2.6 Herstellung von Stocklösungen

#### 3.2.6.1 Aloe vera-Extrakt-Stocklösung

Der *Aloe vera*-Extrakt lag als Pulver vor, welches aus den Blättern der Pflanze *Aloe barbadensis* Miller gewonnen wurde. Für die Stocklösung wurde das Pulver zunächst mithilfe einer Feinwaage abgewogen. 0,02 g wurden mit 10 ml Medium ohne FCS vermischt, indem das Falcon zunächst invertiert wurde und anschließend für ca. 30 s das Vortex-Gerät genutzt wurde. Das Pulver löste sich im Medium. Die Stocklösung betrug 2 mg/ml. Anschließend konnte eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Dazu wurde für eine 1:10 Verdünnung 1 ml der Stocklösung mit 9 ml des Nährmediums ohne FCS vermischt.

#### 3.2.6.2 Rhabarberwurzelextrakt-Stocklösung

Das Rhabarberwurzel-Trockenextrakt der Pflanze *Rheum palmatum* lag als Pulver vor. Für die Stocklösung wurde das Pulver zunächst mithilfe einer Feinwaage abgewogen. 0,02 g wurden dann mit 10 ml Medium ohne FCS vermischt, indem das Falcon zunächst invertiert und anschließend für ca. 30 s auf das Vortex-Gerät gehalten wurde. Das Pulver löste sich nicht vollständig, daher handelte es sich hierbei um eine Suspension. Anschließend wurde die genannte Menge noch einmal 1:10 verdünnt, um auf die Stocklösung von 200 mg/l zu kommen. Folgend konnte eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Dazu wurde für eine 1:10 Verdünnung 1 ml der Stocklösung mit 9 ml des Nährmediums ohne FCS vermischt.

#### 3.2.7 alamarBlue™ Viabilitäts-Assay

Dieses Assay dient zur Ermittlung der Viabilität von Zellen in unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Das alamarBlue™ Assay basiert auf der Veränderung der nicht-fluoreszierenden Indikatorfarbe Resazurin. Nach der Akzeptanz von Elektronen

wechselt der Stoff von der oxidierten zur reduzierten Form und wird als fluoreszierende, pinke Farbe sichtbar (177). Da das alamarBlue™ *cell viability reagent* lichtempfindlich ist, wurde stets mit einer 96-Well-Platte aus schwarzem Plastik gearbeitet. Alle beschriebenen Schritte wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt.

#### 3.2.7.1 Aussäen der Zellen

Zu Beginn des Versuches wurden Fibroblasten wie in Punkt 3.2.1 beschrieben aus einer Zellkulturflasche abgelöst. Nach dem Zählen und Zentrifugieren wurde das Zellpellet durch Resuspendieren in frisches Nährmedium aufgenommen. Hierbei wurde eine Konzentration von 1.000.000 Zellen pro 1 ml hergestellt. Je 1 ml davon wurde entnommen, um ihn mit 24 ml weiterem Nährmedium zu mischen. Dadurch konnte eine Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well in 250 µl in einer 96-Well-Platte erreicht werden. Zum Verteilen der Zellsuspension auf die 96-Well-Platte kam eine Multipette zum Einsatz. Die am Rand gelegenen Wells wurden beim Aussäen stets ausgespart, ebenso die zehnte Spalte. In diese Wells wurden je 100 µl PBS pipettiert, um das Austrocknen der am Rand liegenden Wells zu verhindern. Mithilfe des Mikroskops wurde stets kontrolliert, ob die Zellen optisch gleichmäßig auf die Wells verteilt waren. Nach dem Aussäen stand die Platte für 24 h im Brutschrank.

#### 3.2.7.2 Behandlung der Zellen

Für die Behandlung der Zellen wurde die Flüssigkeit in den Wells mithilfe einer Absaugvorrichtung vorsichtig abgesaugt. Wichtig war hierbei, immer nur eine Spalte abzusaugen und nicht alle zur gleichen Zeit. Die Spalte mit den unbehandelten Zellen und diejenige der Totkontrolle erhielten einen Wechsel des Mediums mit je 200 µl Nährmedium pro Well, welches allerdings nicht mit 10% FCS versetzt wurde. Da die Pflanzenextrakte ebenfalls in Nährmedium ohne FCS gelöst bzw. suspendiert wurden, wurde der Kontrolle ebenfalls kein FCS hinzugefügt. So konnte das FCS, welches das Wachstum der Zellen positiv beeinflusst, die Ergebnisse nicht verfälschen und es wurden gleiche Grundbedingungen geschaffen. Die unterschiedlichen Stocklösungen zur Behandlung der Zellen wurden vorab in 5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt. Dazu wurde zunächst die Stocklösung mit der höchsten Konzentration und dann eine Verdünnungsreihe mit Nährmedium ohne FCS für die jeweiligen weiteren Zielkonzentrationen hergestellt. Je 200 µl der angesetzten Stocklösungen wurden pro

Well in zuvor festgelegte Spalten der 96-Well-Platte pipettiert. Nach dem Start der Behandlung inkubierte die Platte erneut für 24 h im Brutschrank.

### 3.2.7.3 Behandlung mit *Aloe vera*

Die Stocklösung mit der höchsten Konzentration enthielt 2 mg/ml *Aloe vera*-Extrakt, gelöst in Medium ohne FCS. Mit Hilfe dieser wurden die anderen Stocklösungen mit den entsprechenden Zielkonzentrationen aus Tabelle 7 hergestellt. Für jede Behandlungsgruppe wurde zunächst die entsprechende Stocklösung in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß angesetzt. Dafür wurde die Lösung immer für zehn Wells angesetzt.

**Tabelle 7: Plattenbelegung Viabilitätsassay mit AV**

<b>Spalte</b>	<b>Gesamtkonzentration</b>	<b>Zusammensetzung pro Well</b>
2	10 µg/ml AV	2,5 µl AV + 197,5 µl Medium
3	50 µg/ml AV	5 µl AV + 195 µl Medium
4	100 µg/ml AV	10 µl AV + 190 µl Medium
5	250 µg/ml AV	25 µl AV + 175 µl Medium
6	500 µg/ml AV	50 µl AV + 150 µl Medium
7	1000 µg/ml AV	100 µl AV + 100 µl Medium
8	2000 µg/ml AV	200 µl AV
9	0 µg/ml AV (unbehandelt)	200 µl Medium
11	0 µg/ml AV (Totkontrolle)	200 µl Medium

### 3.2.7.4 Behandlung mit Rhabarberwurzelextrakt

Für die Behandlung der Fibroblasten mit Rhabarberwurzelextrakt wurde eine Stocklösung von 200 mg/l verwendet. Mit Hilfe dieser wurden die anderen Stocklösungen mit den entsprechenden Zielkonzentrationen aus Tabelle 8 hergestellt. Für jede Behandlungsgruppe wurde zunächst die entsprechende Stocklösung in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß angesetzt. Dafür wurde die Lösung immer für zehn Wells angesetzt. Vor der Verwendung wurde die Suspension invertiert. Der Extrakt befand sich dabei in Suspension mit Medium, welches nicht mit FCS versetzt wurde. Auch die unbehandelte Kontrolle und die Totkontrolle wurden ohne FCS behandelt. Abb. 1 zeigt eine exemplarische Plattenbelegung.

**Tabelle 8: Plattenverteilung Viabilitätsassay mit RWE**

Spalte	Gesamtkonzentration	Zusammensetzung
2	2 mg/l RWE	2,5 µl RWE + 247,5 µl Medium
3	3 mg/l RWE	3,75 µl RWE + 246,25 µl Medium
4	4 mg/l RWE	5 µl RWE + 245 µl Medium
5	20 mg/l RWE	25 µl RWE + 225 µl Medium
6	40 mg/l RWE	50 µl RWE + 200 µl Medium
7	100 mg/l RWE	125 µl RWE + 125 µl Medium
8	200 mg/l RWE	250 µl RWE
9	0 mg/l RWE (unbehandelt)	250 µl Medium
11	0 mg/l RWE (Totkontrolle)	250 µl Medium

**Abbildung 1: Exemplarisches Bild des alamarBlue™ Viabilitätsassay am Beispiel der Behandlung mit RWE**

### 3.2.7.5 Messung

24 h nach dem Start der Behandlung erfolgte die Messung der Viabilität. Zunächst wurde die Totkontrolle in der elften Spalte mit 70% Ethanol behandelt. Dazu wurden nach Absaugen des Mediums 100 µl 70%iger Ethanol in jedes Well der elften Spalte pipettiert und dann für 10 min inkubiert. Das PBS in der zehnten Spalte sorgte dafür, dass kein Ethanol in die Wells einer Behandlungsgruppe gelangen und die Viabilität verändern konnte.

Eine Mischung aus Nährmedium ohne FCS (90%) und alamarBlue™ *cell viability reagent* (10%) konnte in dieser Zeit vorbereitet werden. Für die Behandlung einer Platte wurden 2 ml alamarBlue™ und 18 ml Nährmedium in einem Falcon gemischt. Dieses wurde mit einem Stück Aluminiumfolie umschlossen, da das Reagenz lichtempfindlich ist. Das Nährmedium in allen Wells sowie das Ethanol in der Totkontrolle wurden erneut abgesaugt. Mithilfe der Multipette wurden 200 µl der alamarBlue™-Mischung in jedes Well gegeben. Diese Mischung hatte zu diesem Zeitpunkt eine intensive, violett-blaue Farbe.

Direkt im Anschluss erfolgte die erste Messung. Sie wurde mithilfe des Fluoroskan und der Software Askent durchgeführt und gespeichert. Nach 4 h im Brutschrank wurde die zweite Messung durchgeführt. Hier veränderte sich, je nach Ergebnis, die Farbe der Mischung in den Wells. Zeigte sich die Substanz magentafarben, wies das auf viele lebende Zellen hin, während sich bei der Totkontrolle stets eine blaue Farbe beobachten ließ. Dabei wurde die relative Fluoreszenz bei 538 nm Anregungsfilter und 600 nm Emissionsfilter gemessen und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Messung nach 4 h wurde bei der Auswertung von der 0-h-Messung abgezogen, um jedes Well direkt mit seinem Ausgangswert vergleichen zu können.

### 3.2.8 Scratch-Assay

#### 3.2.8.1 Aussäen der Zellen

Mithilfe eines *Scratch-Assays* konnte die Migration von Zellen unterschiedlicher Behandlungsgruppen beobachtet werden. Dabei wird durch einen zellfreien Spalt eine Wunde nachgeahmt (178).

Zunächst wurden die Fibroblasten wie Kapitel 3.2.1 beschrieben von der Zellkulturschale gelöst, gezählt und zentrifugiert. Dann wurde eine Stocklösung mit 1.000.000 Zellen pro 1 ml erzeugt. 800.000 Zellen wurden hieraus entnommen (800 µl) und mit 1,2 ml Nährmedium gemischt. So wurde eine Zellstocklösung mit 400.000 Zellen pro ml erzielt. Diese Zellsuspension konnte nun für das Bestücken der Schalen verwendet werden. Es handelte sich dabei um ibidi Zellkulturschalen, welche mit einem sogenannten *Culture insert* versehen sind. Dabei handelt es sich um eine kleine Silikoneinlage mit zwei Kammern, welche am Boden festgeklebt ist. Durch das Aussäen der Zellen in die beiden Kammern entstanden zwei konfluente Zellrasen, die durch einen zellfreien Spalt definierter Breite voneinander getrennt waren. In jede Kammer wurden 70 µl der Zellsuspension pipettiert. Nach 24 h Inkubation im

Brutschrank konnten die Silikonkammern mithilfe einer sterilen Pinzette vorsichtig vom Boden abgelöst werden. Durch die Form der Kammer entstanden zwei Zellrasen, zwischen welchen sich ein unbesiedelter, ca. 500 µm breiter Spalt befand.

### 3.2.8.2 Behandlung mit *Aloe vera*

Nun wurden die Schalen unterschiedlich behandelt. Als Kontrolle erhielt eine Schale 2 ml Medium ohne FCS.

Verschiedene Konzentrationen von *Aloe vera* wurden getestet. Die *Aloe-Vera*-Stocklösung betrug 2 mg/ml, dafür wurde das sprühgetrocknete *Aloe barbadensis*-Pulver in Medium ohne FCS gelöst. Auch für die unbehandelten Zellen wurde Medium ohne FCS benutzt. Mit Hilfe dieser Stocklösung wurden die anderen Lösungen mit den entsprechenden Zielkonzentrationen aus Tabelle 9 hergestellt. Für jede Behandlungsgruppe wurde zunächst die entsprechende Stocklösung in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß angesetzt. Dafür wurde die Lösung immer für zehn Wells angesetzt. Die unterschiedlichen Lösungen wurden dann auf die Schale pipettiert.

**Tabelle 9: Behandlungsgruppen Scratch-Assay AV**

<b>Gesamtkonzentration</b>	<b>Zusammensetzung</b>
100 µg/ml AV	100 µl AV + 1900 µl Medium
500 µg/ml AV	500 µl AV + 1500 µl Medium
1000 µg/ml AV	1000 µl AV + 1000 µl Medium
2000 µg/ml AV	2000 µl AV
0 µg/ml AV (unbehandelt)	2 ml Medium

### 3.2.8.3 Behandlung mit *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt

Die folgende Tabelle 10 zeigt die Behandlung mit *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt. Das Gesamtvolumen betrug stets 2 ml. Für jede Behandlung wurde Nährmedium ohne FCS verwendet. Die verwendeten Stocklösungen enthielten 2 mg/ml *Aloe vera* und 200 mg/l Rhabarberwurzelextrakt. Mit Hilfe dieser Stocklösung wurden die anderen Lösungen mit den entsprechenden Zielkonzentrationen aus Tabelle 10 hergestellt. Für jede Behandlungsgruppe wurde zunächst die entsprechende Stocklösung in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß angesetzt. Dafür wurde

die Suspension immer für zehn Wells angesetzt. Die unterschiedlichen Gemische wurden dann auf die Schale pipettiert. Die Lösungen, die Rhabarberwurzelextrakt enthielten, wurden vor der Verwendung invertiert. Als Kontrolle erhielt eine Schale 2 ml Medium ohne FCS.

**Tabelle 10: Behandlungsgruppen Scratch-Assay AV und RWE**

<b>Gesamtkonzentration</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Unbehandelt	2 ml Medium
2mg/l RWE	20 µl RWE + 1980 µl Medium
20 mg/l RWE	200 µl RWE + 1800 µl Medium
2 mg/l RWE + 500 µg/ml AV	20 µl RWE + 500 µl AV + 1480 µl Medium
20 mg/l RWE + 500 µg/ml AV	200 µl RWE + 500 µl AV + 1300 µl Medium
500 µg/ml AV	500 µl AV + 1500 µl Medium

#### 3.2.8.4 Mikroskopische Dokumentation und Auswertung

Direkt im Anschluss entstanden die ersten Aufnahmen mit dem Durchlichtmikroskop. Von jedem Spalt entstanden vier Bilder, welche diesen fast vollständig darstellten. Die ersten Bilder wurden als 0-h-Aufnahme (0 h nach Behandlung) abgespeichert. Alle 24 h wurden weitere Mikroskop-Bilder erstellt, nach zehn Tagen (240 h) war der Versuch beendet. Die Bilder wurden stets mit einer zehnfachen Vergrößerung aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug ca. 40 ms, wobei diese variieren konnte, da die Helligkeit des Bildes manuell eingestellt wurde. Die Aufnahmen wurden mit dem Nikon Eclipse TE2000-U und der NIS Elements-Software erstellt.

Mit der Software T-Scratch wurde der Versuch ausgewertet. Das Programm erkennt Stellen, an denen sich Zellen befinden und kann so prozentual die freie, nicht bewachsene Fläche errechnen. Die bewachsene Fläche wird dabei markiert. Alle Bilder wurden noch einmal kontrolliert. Falls beispielsweise Teile eines Wirkstoffes als Zellrasen markiert wurden, konnte manuell nachjustiert werden.

#### 3.2.9 Phalloidin-Färbung

Zur Beurteilung des Zytoskeletts der Fibroblasten unterschiedlicher Behandlungsgruppen wurde eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Zunächst wurden

dafür Fibroblasten in zwei 4-Well-Objektträger (*Chamber Slides*) ausgesät. In jedes Well wurden je 10.000 Zellen in 500 µl Zellkulturmedium mit FCS pipettiert. Nach 24 h im Brutschrank wurden diese behandelt. Bei der unbehandelten Kontrolle wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Die verwendeten Stocklösungen enthielten 2 mg/ml *Aloe vera* und 200 mg/l Rhabarberwurzelextrakt. Mit Hilfe dieser Stocklösung wurden die anderen Lösungen mit den entsprechenden Zielkonzentrationen aus Tabelle 11 hergestellt. Für jede Behandlungsgruppe wurde zunächst die entsprechende Stocklösung in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß angesetzt. Die unterschiedlichen Gemische wurden dann auf die Schale pipettiert. Die Lösungen, die Rhabarberwurzelextrakt enthielten, wurden vor der Verwendung invertiert. Als Kontrolle erhielt eine Schale 2 ml Medium ohne FCS.

**Tabelle 11: Behandlungsgruppen Phalloidin-Färbung AV und RWE**

<b>Gesamtkonzentration</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Unbehandelt	500 µl Medium
2mg/l RWE	5 µl RWE + 495 µl Medium
20 mg/l RWE	50 µl RWE + 450 µl Medium
2 mg/l RWE + 500 µg/ml AV	5 µl RWE + 125 µl AV + 370 µl Medium
20 mg/l RWE + 500 µg/ml AV	50 µl RWE + 125 µl AV + 325 µl Medium
500 µg/ml AV	125 µl AV + 375 µl Medium

Nach weiteren 24 h im Brutschrank startete der Färbevorgang. Zunächst wurde das Medium abpipettiert. Dann wurden die Wells mit 4%igem Paraformaldehyd bedeckt. Nach 10 min waren die Zellen fixiert. Nun konnte der Boden des Objektträgers abgelöst werden, was die weitere Verwendung vereinfachte. Dieser wurde dann dreimal 5 min in eine Küvette mit PBS getaucht, um gewaschen zu werden. Anschließend wurde 0,1%iges Triton-X in PBS auf die Objektträger aufgetragen, sodass der Zellrasen komplett bedeckt war. Nach 5 min Einwirkzeit wurde der dreimalige Vorgang des Waschens mit PBS wiederholt. Danach wurde 1% Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur belassen. In dieser Zeit wurde die Phalloidin-Lösung angesetzt: Zunächst wurde das Phalloidin in 1 ml Methanol gelöst, sodass sich eine Konzentration von 300 *units/ml* ergab. Davon wiederum wurden 20 µl mit 5,98 ml PBS vermischt. Dies wurde auf die Objektträger pipettiert und

wirkte wieder für 60 min ein. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Für eine Minute wurde Bisbenzimid auf die Objektträger pipettiert, um auch die Zellkerne anzufärben. Der Waschvorgang mit PBS wurde zweimal wiederholt. Abschließend konnten die Objektträger mit Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckt werden, indem ein Deckglas daraufgelegt wurde. Die Luftblasen wurden seitlich herausgedrückt. Nach 24 h waren die Objektträger getrocknet und konnten mithilfe des Keyence BZ-9000 Mikroskop und der passenden BIOREVO BZ-9000 Software dargestellt und aufgenommen werden.

Um die Färbung auszuwerten, wurde zunächst die Länge der Zellen mit dem Mess-Tool von ImageJ gemessen. Um die Intensität zu bestimmen, wurden die Bilder, ebenfalls mithilfe von ImageJ, auf 16-bit konvertiert, die mittleren Grauwerte gemessen und durch die auf dem Bild sichtbare Zellzahl geteilt.

#### 3.2.10 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie kann u.a. eine Zellzyklusanalyse durchgeführt werden. Die Methode beruht auf der Messung der intrazellulären DNA-Menge, die abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase schwankt (179). Zunächst wurden die Zellen in fünf kleine Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurde eine Konzentration von 1 Mio. Zellen pro 1 ml in der Zellstocklösung eingestellt, von der pro Flasche 0,5 ml entnommen wurden und mit 4,5 ml Nährmedium ausgesät wurden. So wurde eine Zellzahl von ca. 500.000 Zellen pro Flasche erreicht. Nach 24 h im Brutschrank wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Rhabarberwurzel und *Aloe vera* behandelt. Die unbehandelte Gruppe erhielt einen Mediumswechsel mit Medium ohne FCS. Nun wurden die Proben für 48 h erneut in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde zunächst der Überstand der Flaschen in je ein Falcon überführt. Die Zellen wurden mit jeweils 2 ml T/E für 5 min abgelöst. Anschließend wurde die Reaktion mit je 2 ml Medium abgestoppt. Diese Mischung wurde nun zu den Überständen in den Falcons pipettiert. Für 5 min wurden diese bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand über dem Zellpellet behutsam abgekippt und Mediumsreste vollständig abgesaugt. Das Pellet wurde in 500 µl PBS aufgenommen. Dann wurden 5 ml -20 °C kaltes 70%iges Ethanol in jedes Falcon gegeben und die Suspension sorgfältig gemischt. Für mindestens ca. 24 h verblieben die Röhrchen im Gefrierschrank bei -20 °C.

Um die Zellen für die Durchflusszytometrie vorzubereiten, wurden die Röhren zunächst aus dem Gefrierschrank entnommen und anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in je 2 ml BSA-T-PBS aufgenommen. Das Gemisch musste nun 5 min ruhen. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und nachfolgend der Überstand abgesaugt. Die Pellets wurden in 100 µl *Staining solution* aufgenommen. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit je 200 µl PBS verdünnt und in *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-geeignete Röhren überführt und anschließend mit dem Durchflusszytometer gemessen.

### 3.2.11 *Berechnung des phänomenologischen Kombinationsindex*

Das Zusammenwirken von *Aloe vera* und *Rheum palmatum* sollte genauer untersucht werden. Eine auf den Prinzipien des Medianeffekts basierende Methode wurde entwickelt, um die Begriffe Synergie und Antagonismus in Bezug auf die Zellmigration zu bestimmen (180). Diese Methode basierte auf verallgemeinerten Überlegungen zur Massenwirkung durch grundlegende Überlegungen. Der streng prinzipienbasierte Index von Chou *et al.* (180) wurde jedoch zu einem phänomenologische Kombinationsindex (pCI) umgewandelt, um diese Unterschiede zu berücksichtigen, da im Rahmen dieser Dissertation mit Pflanzenextrakten mit unterschiedlichen Wirkstoffen und gut definierten Zellkulturproben gearbeitet wurde.

Um die mögliche Synergie der Pflanzenextrakte quantitativ zu analysieren, wurde durch den pCI errechnet. Dafür wurde die folgende Formel verwendet.

$$pCI_{AV} = f_{AVRWE}/f_{AV} \text{ and } pCI_{RWE} = f_{AVRWE}/f_{RWE}$$

Unter Verwendung dieser Formel reicht ein Quotient < 1 aus, um eine Synergie der Extrakte anzunehmen.

### 3.2.12 *Statistische Auswertung*

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm Prism 6.0 für Windows (GraphPad Software Inc.) verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen ausgedrückt. Der Kolmogorov–Smirnov Normalitätstest wurde verwendet, um festzustellen, ob eine Normalverteilung vorlag.

Falls ja, wurde der ANOVA-Test durchgeführt, wenn nicht der Test nach Kruskal-Wallis. Ein p-Wert geringer als 0.05 wurde als statistisch signifikant interpretiert. Die Korrektur bei multiplen Vergleichen wurde mit Bonferroni durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden als \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$  angegeben.

### 3.2.13 Grafiken

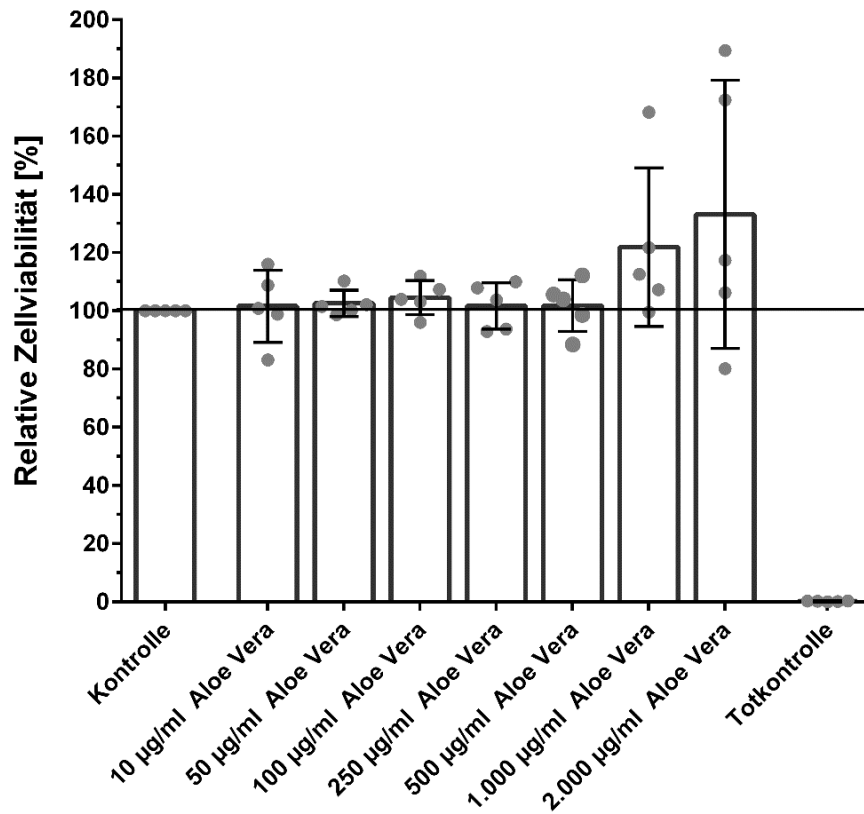
Die Grafiken wurden mithilfe der Programme *GraphPad Prism* und *Inkscape 1.1* erstellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellviabilität

#### 4.1.1 *Aloe vera*

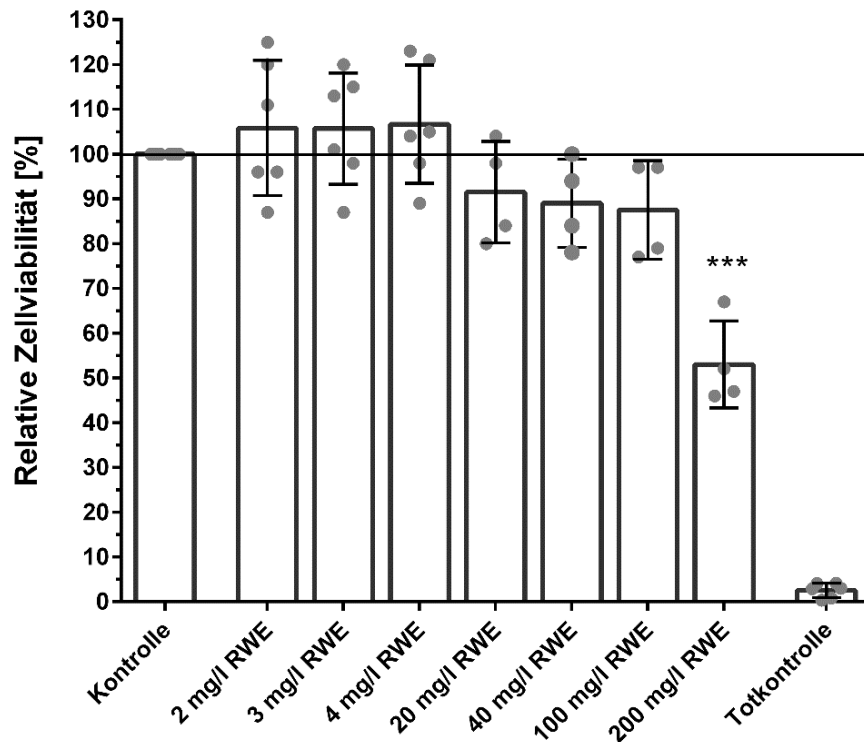
Mithilfe des alamarBlue™-Viabilitäts-Assays konnte gezeigt werden, dass *Aloe vera* in den Konzentrationen von 10 µg/ml bis 2.000 µg/ml zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität von humanen, primären Fibroblasten führte. Eine Konzentration von 1.000 µg/ml *Aloe vera* erhöhte die Viabilität zwar leicht, jedoch nicht signifikant. In Konzentrationen von 2.000 µg/ml fiel auf, dass die Viabilität der Fibroblasten von manchen Patienten erhöht, bei anderen jedoch verringert wurde, was anhand der in Abb. 2 dargestellten Einzelmesspunkte sichtbar wird. Verglichen wurde stets mit der unbehandelten Gruppe.



**Abbildung 2: Viabilität von Fibroblasten nach einer Behandlung mit AV.** Die Abbildung stellt die Mittelwerte einschließlich Standardabweichungen als Säulendiagramm dar. N = 5 mit menschlichen, primären Fibroblasten von verschiedenen Patienten. Die grauen Punkte zeigen die einzelnen Messwerte der unabhängigen Durchgänge.

#### 4.1.2 Rhabarberwurzelextrakt

Niedrige Konzentrationen des Rhabarberwurzelextraktes von < 100 µg/ml zeigten keinen signifikanten zytotoxischen Effekt. Höhere Konzentrationen ab 200 µg/ml führten zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität der Fibroblasten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dies wird anhand von Abb. 3 sichtbar.

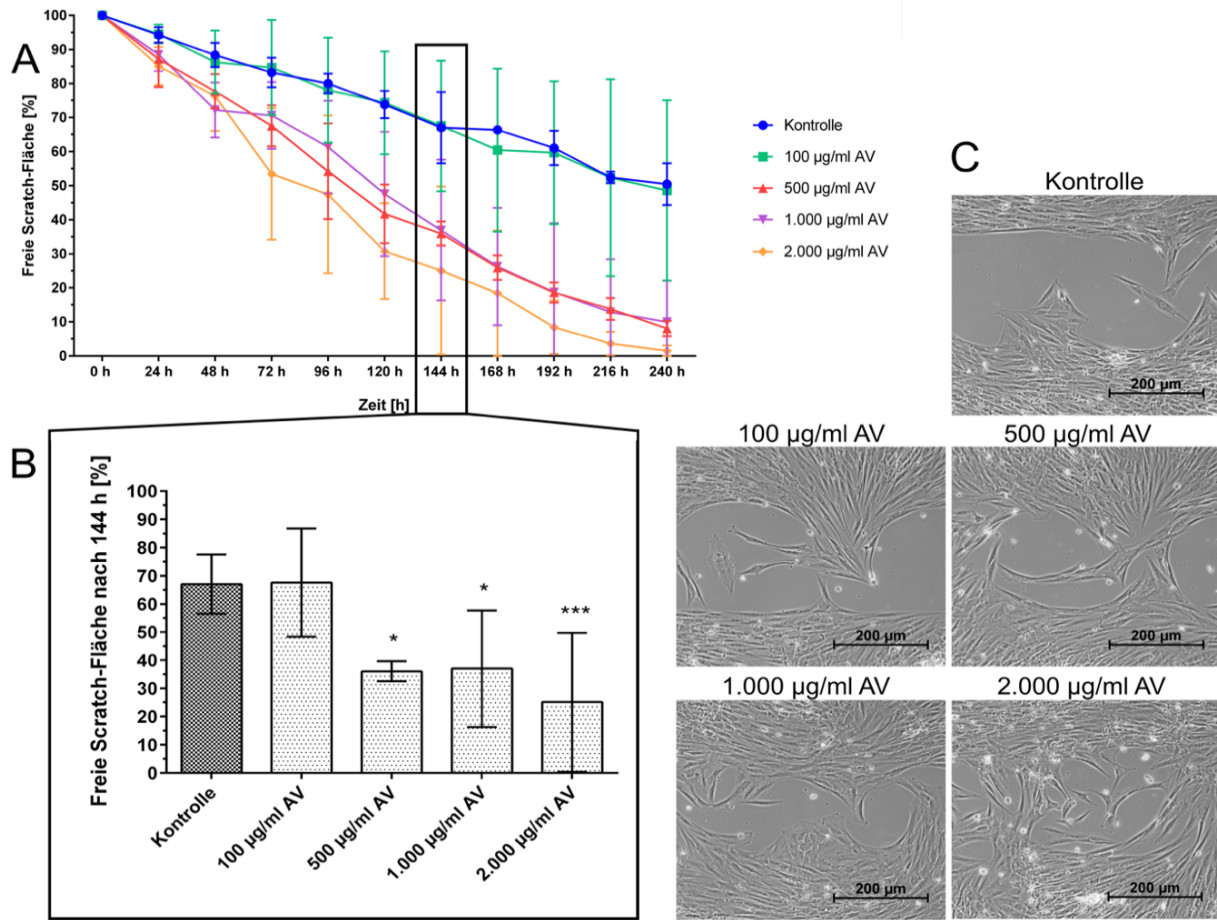


**Abbildung 3: Viabilität von Fibroblasten nach einer Behandlung mit RWE.** Die Ergebnisse wurden als Säulendiagramm mit Mittelwerten einschließlich Standardabweichung dargestellt.  $N \geq 5$  mit menschlichen, primären Fibroblasten von verschiedenen Patienten. Die grauen Punkte zeigen die einzelnen Messwerte der unabhängigen Durchgänge.

## 4.2 Scratch-Assay

### 4.2.1 Aloe vera

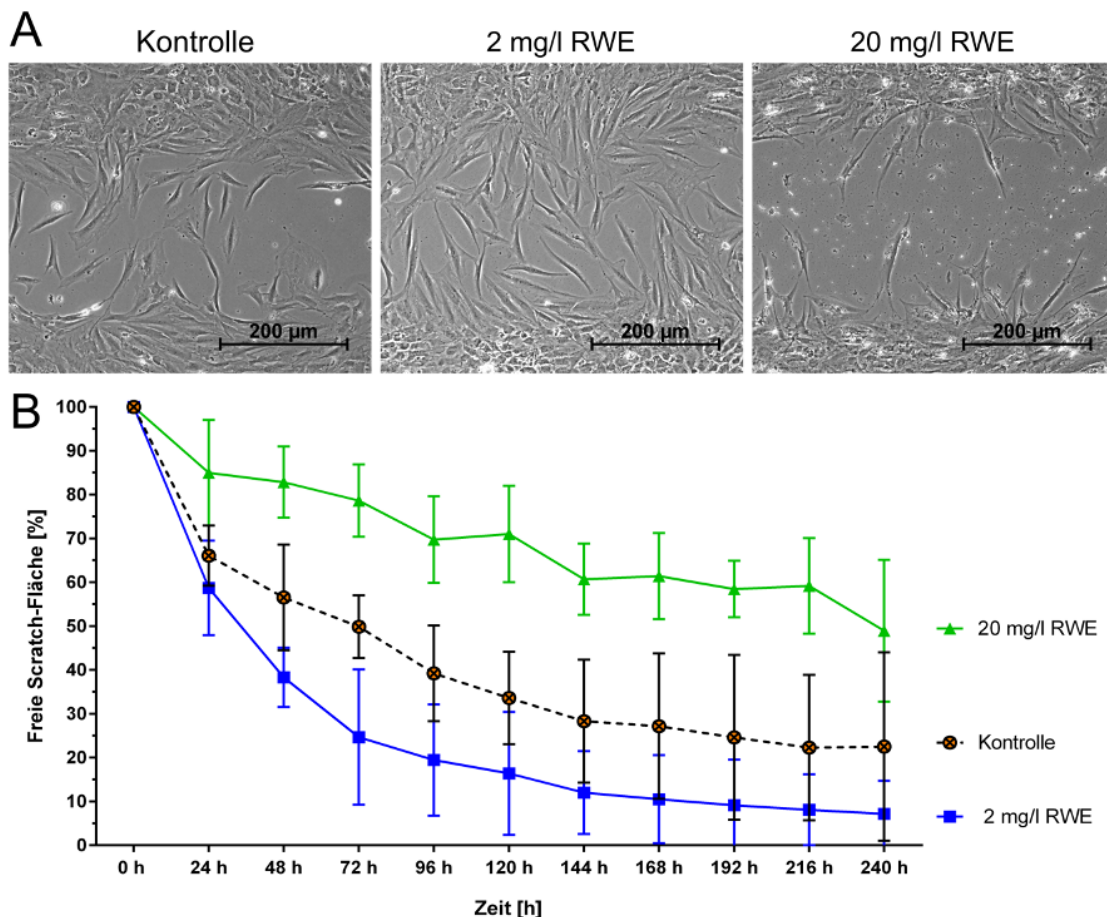
In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass *Aloe vera* in der Lage ist, die Schließung eines anfangs zellfreien Spaltes in einem konfluenten Zellrasen aus humanen Fibroblasten zu beschleunigen. In höheren Konzentrationen zwischen 500  $\mu\text{g/ml}$  und 2.000  $\mu\text{g/ml}$  konnte der Spalt durch *Aloe vera* schneller geschlossen werden. Nach 240 h war der Spalt bei einer Konzentration von 2.000  $\mu\text{g/ml}$  vollständig geschlossen und bei Konzentrationen von 500-1.000  $\mu\text{g/ml}$  fast vollständig geschlossen (>90%), wie in Abb. 4 dargestellt. In der Kontrollgruppe hingegen war der Spalt nach 240 h nur zu ca. 50% geschlossen.



**Abbildung 4: Effekt von AV auf die Migration von Fibroblasten.** A zeigt den zeitlichen Verlauf der mittleren freien Fläche im Scratch-Assay zwischen 0 h und 240 h als Kurvendiagramm mit Standardabweichung, B zeigt die Mittelwerte der freien Scratch-Fläche in % nach 144 h als Säulendiagramm mit Standardabweichung. C zeigt repräsentative Bilder des ehemals zellfreien Spaltes nach 144 h unter dem Einfluss unterschiedlicher Aloe vera Konzentrationen. N = 3 mit menschlichen primären Fibroblasten von verschiedenen Patienten.

#### 4.2.2 Rhabarberwurzelextrakt

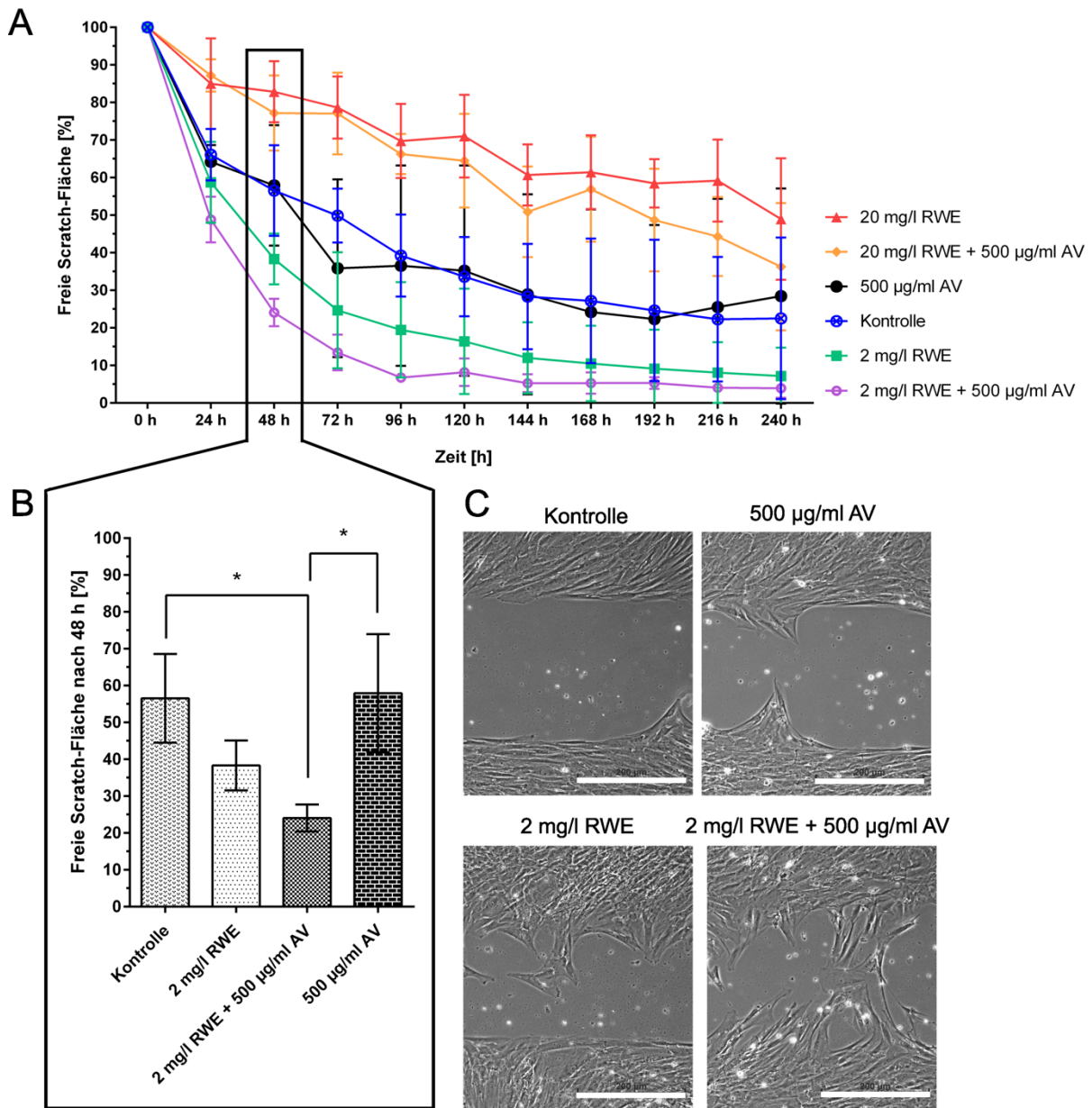
Der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Rhabarberwurzelextraktes auf die Migration von Fibroblasten wurde ebenfalls getestet. Die höhere Konzentration von 20 mg/l zeigte dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe eine langsamere Schließung des Spaltes, wohingegen die geringere Konzentration von 2 mg/l den Spaltschluss vorantrieb. Abbildung 5 zeigt repräsentative Bilder sowie den zeitlichen Verlauf als Kurvendiagramm.



**Abbildung 5: Effekt von RWE auf die Migration von Fibroblasten.** A zeigt repräsentative Bilder des ehemals zellfreien Spaltes unter dem Einfluss verschiedener Rhabarberwurzelextrakt-Konzentrationen, B zeigt den Verlauf der mittleren freien Fläche im Scratch-Assay zwischen 0 h und 240 h als Kurvendiagramm mit Standardabweichung. N = 3 mit menschlichen primären Fibroblasten von verschiedenen Patienten.

#### 4.2.3 Aloe vera und Rhabarberwurzelextrakt – Kombination

Schließlich wurde der Einfluss einer Kombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt auf die Migration von Fibroblasten untersucht, wie in Abb. 6 dargestellt. Dazu wurde eine Konzentration von 500 µg/ml *Aloe vera* mit einer Konzentration von 2 mg/l Rhabarberwurzelextrakt zusammen eingesetzt und mit dem Effekt der Einzelkomponenten verglichen. Das Zuwachsen des Spaltes wurde durch diese Kombination signifikant beschleunigt, verglichen mit *Aloe vera* allein und verglichen mit der Kontrolle (nach 48 h:  $p < 0.05$ ). Nach der Behandlung mit dieser Kombination war der Spalt nach 96 h bereits fast vollständig geschlossen. Mit der Behandlung von Rhabarberwurzelextrakt alleine hingegen war der Spalt erst nach 144 h fast vollständig bewachsen.

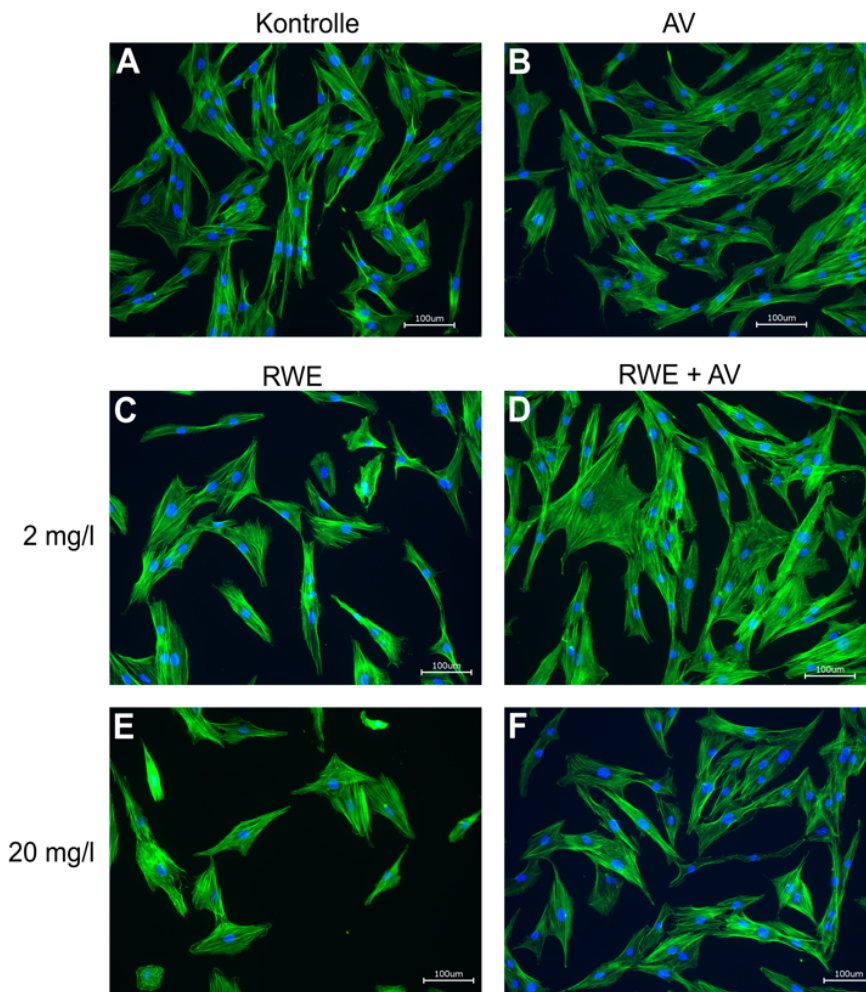


**Abbildung 6: Effekt von AV und RWE auf die Migration von Fibroblasten.** A zeigt den zeitlichen Verlauf der mittleren freien Fläche im Scratch-Assay zwischen 0h und 240 h als Kurvendiagramm mit Standardabweichung, B zeigt die Mittelwerte der freien Scratch-Fläche nach 48 h als Säulendiagramm mit Standardabweichung und C repräsentative Bilder des ehemals zellfreien Spaltes nach 48 h unter dem Einfluss von Aloe vera und Rhabarberwurzel alleine und deren Kombination. N = 3 mit menschlichen primären Fibroblasten von verschiedenen Patienten.

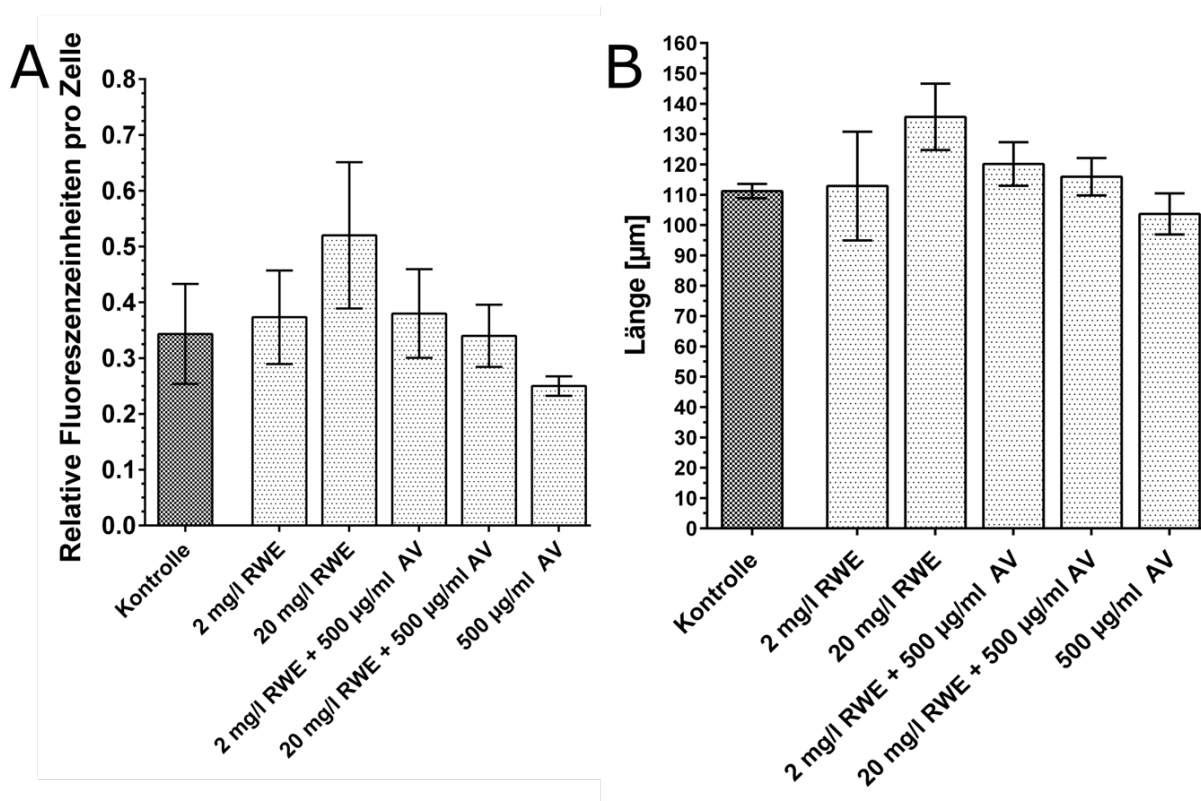
### 4.3 Phalloidin-Färbung

Zellmigration steht unweigerlich mit dem Umbau des Zytoskeletts in Verbindung. Um zu überprüfen, ob die Extrakte aus Rhabarberwurzel und *Aloe vera* einen Effekt auf die Aktinfilamente haben, wurden diese mithilfe von Phalloidin angefärbt und untersucht. Die Färbung ergab, dass sich die Gruppen kaum unterschieden und keine

signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Weder die durchschnittliche Länge der Zellen noch die Intensität der Aktinfärbung pro Zelle zeigten Auffälligkeiten beim Vergleich der behandelten Gruppen zur Kontrollgruppe. Repräsentative Fotos der Färbung sind in Abb. 7 gezeigt. Abb. 8 zeigt die relativen Fluoreszenzeinheiten pro Zelle, sowie die Länge der Zellen im Vergleich zwischen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen.



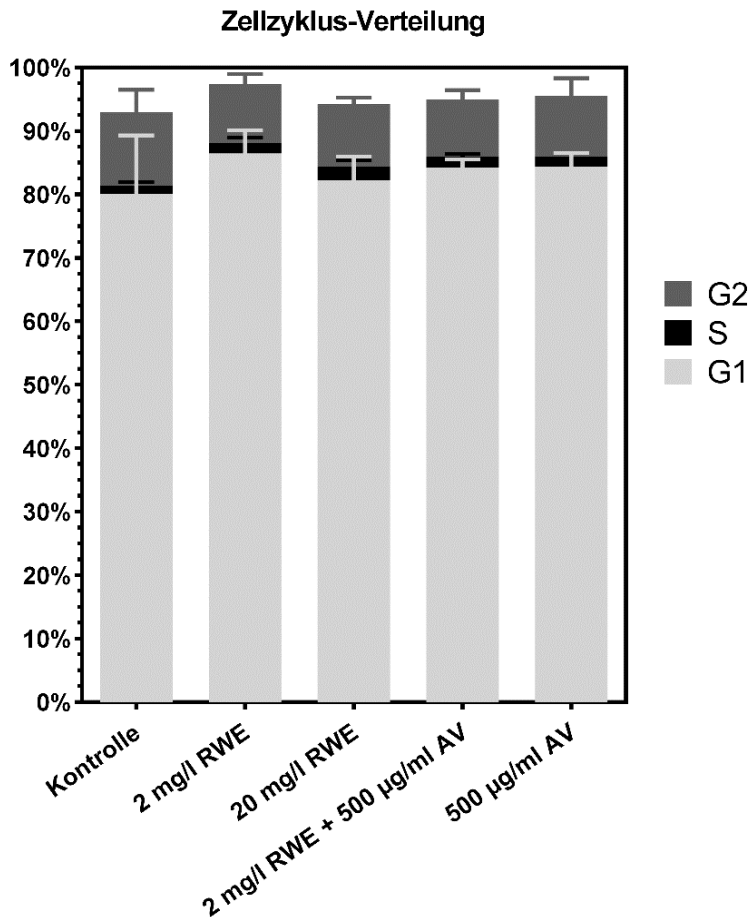
**Abbildung 7: Repräsentative Bilder der Phalloidin-Färbung mit verschiedenen Behandlungsgruppen mit AV und RWE. N = 1 mit menschlichen primären Fibroblasten eines Patienten.**



**Abbildung 8: Phalloidin-Färbung von Fibroblasten mit AV und Rhabarberwurzelextrakt RWE.** Abbildung A zeigt die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheiten pro Zelle und Abbildung B Mittelwerte der Länge der Zellen als Säulendiagramme mit Standardabweichung.  $N = 1$  von primären menschlichen Fibroblasten.

#### 4.4 Zellzyklusanalyse durch Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von Rhabarberwurzelextrakt, *Aloe vera* und deren Kombination auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Diese ergab, dass weder die Extrakte einzeln noch die Kombination aus beiden die Zellzyklusverteilung signifikant beeinflussten. In Abb. 9 ist die Zellzyklusverteilung, abhängig von der Behandlungsgruppe, dargestellt.



**Abbildung 9: Zellzyklusverteilung von Fibroblasten nach der Behandlung mit AV und RWE.** Die Abbildung zeigt ein gestapeltes Säulendiagramm der mittleren prozentualen Anteile an Zellen in der G1-, der S- und der G2-Phase an der Gesamtpopulation mit Standardabweichung. N = 3 mit menschlichen primären Fibroblasten.

#### 4.5 Phänomenologischer Kombinationsindex

Die Kombination aus *Aloe vera* und *Rheum palmatum* zeigte synergistische Effekte auf die Fibroblastenmigration *in vitro*. Da die Kombination 2 mg/l RWE + 500 µg/ml AV für alle Zeitpunkte im *Scratch*-Assay deutlich niedrigere Werte aufwies, waren beide pCI-Ratios, pCI<sub>AV</sub> und pCI<sub>RWE</sub>, durch elementare Analyse streng <1. Bei einem Quotienten < 1 kann eine Synergie der Extrakte angenommen werden, weshalb für die Kombination bei den genannten Kombinationen eine synergistische Wirkung angenommen werden kann.

## 4.6 Patent

Am 15.08.2022 wurde ein europäisches Patent (EP22190349.5) mit dem Namen *Compositions for use in the prevention or treatment of oral or dental disorders or dysfunctions* auf den synergistischen Effekt von AV und RWE eingereicht.

## 5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Kontext dargestellt und hinsichtlich ihrer Validität und klinischen Implikationen erläutert sowie diskutiert. Zunächst werden die Pflanzenextrakte aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel einzeln diskutiert, im Anschluss die Kombination dieser. Nach der Betrachtung der Extrakte werden die in dieser Dissertation verwendeten Methoden diskutiert. Zuletzt werden alle gewonnenen Ergebnisse in einen klinischen Kontext gesetzt.

### 5.1 *Aloe vera*

*Aloe vera* zeigte für die Wundheilung vielversprechende Ergebnisse: Der Extrakt wies eine migrationsfördernde und biokompatible Wirkung auf. Die Viabilitätstests im Rahmen dieser Arbeit ergaben einen breiten Bereich der *Aloe vera*-Biokompatibilität im Bereich von 10–2.000 µg/ml. Darüber hinaus konnte eine hohe *Aloe vera*-Konzentration von 500 µg/ml die Stoffwechselaktivität von Fibroblasten leicht stimulieren. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, die zeigten, dass *Aloe vera* die Lebensfähigkeit von Keratinozyten stimuliert (145). Die laut der Literatur erhöhte Migration der Fibroblasten konnte mithilfe der Dissertation bestätigt werden (144), die Viabilität war allerdings nicht signifikant erhöht. Dies steht im Gegensatz zur Literatur, in der eine erhöhte Fibroblasten-Proliferation beschrieben wurde. Allerdings wurden hier Nieren-Fibroblasten von Hasen verwendet (144). Im Vergleich zu weiteren Studien zu Fibroblasten von Teplicki *et al.* und Shafaie *et al.* hatte *Aloe vera* in unserer Studie keinen proliferativen Effekt auf Fibroblasten (145, 181).

Oft wird die Wirkung von *Aloe vera* auf die enthaltenen Anthrachinone zurückgeführt. Laut Hersteller waren in dem von uns verwendeten sprühgetrocknetem *Aloe vera*-Pulver keine relevanten Aloe-Emodin-Konzentrationen enthalten. Aufgrund der

antimikrobiellen Wirkung der Anthrachinone könnte der antibakterielle Effekt der *Aloe vera* auf diese zurückzuführen sein. Aloe-Emodin wurde in frisch zubereitetem *Aloe vera*-Gel hingegen bereits nachgewiesen (182). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung einer detaillierten Charakterisierung der Pflanzenextrakte. Zusätzlich könnten bei Pflanzenextrakten allgemein große Qualitätsunterschiede bestehen (183).

## 5.2 Rhabarberwurzelextrakt

In Bezug auf die Biokompatibilität von Rhabarberwurzelextrakt konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. In der Literatur wurde die Zytotoxizität von Rhabarberwurzelextrakt bereits bei menschlichen Karzinomzellen getestet (184, 185), jedoch nicht bei menschlichen oralen Fibroblasten (11). Hong *et al.* entdeckten, dass ein isoliertes Anthrachinon von Rhabarberwurzelextrakt die Apoptose und den G0/G1-Zellzyklus bei menschlichen Brustkrebszellen stoppt und somit eine antiproliferative Wirkung zeigt (186). In Bezug auf ihre Reaktion auf verschiedene Substanzen sind humane primäre Fibroblasten jedoch möglicherweise nicht direkt mit Krebszelllinien vergleichbar, außerdem wurden in diesen Experimenten höhere Konzentrationen verwendet.

Im Rahmen der Versuche wurde festgestellt, dass Rhabarberwurzelextrakt-Konzentrationen für Fibroblasten in Konzentrationen von 2 g/ml bis zu 100 g/ml weitgehend biokompatibel waren und nur geringfügige Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatten. Somit hat diese Dissertation erstmals gezeigt, dass niedrige Rhabarberwurzelextrakt-Konzentrationen biokompatibel und sogar migrationsfördernd sind.

Mit dem verwendeten Rhabarberwurzelextrakt aus *Rheum palmatum* wurde bereits eine *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Analyse durchgeführt. Diese bestätigte, dass einer der wichtigsten bioaktiven Bestandteile des hier verwendeten Rhabarberwurzelextrakts das Anthrachinon Rhein ist, das nicht nur zur antibakteriellen Wirksamkeit beiträgt, sondern auch die Fibroblastenmigration fördert. Rhein konnte zu ca. 5% im Extrakt von *Rheum palmatum* nachgewiesen werden (10). Verschiedene Anthrachinone wie Rhein, die Derivate des Chinons Anthracen, konnten bereits mit einer Förderung der Wundheilung und einer antimikrobiellen Wirkung (10, 187) in Verbindung gebracht werden. Eine genaue Analyse der weiteren Bestandteile des Rhabarberwurzelextraktes könnte in Zukunft noch erfolgen.

Bei *Rheum palmatum* sind je nach Herkunft und Gewinnung der Extrakte große Qualitätsunterschiede denkbar. Im verwendeten Nährmedium für Fibroblasten löste sich der Rhabarberwurzelextrakt nicht. Eine vollständige Lösung durch den Zusatz von verschiedenen Prozentanteilen von Ethanol konnte in Vorversuchen zwar erreicht werden, dies führte jedoch zu einer erheblichen Reduktion der Fibroblasten beim Viabilitätsassay, weshalb die Suspension genutzt wurde. Dies ermöglichte eine Durchführung der Methode, bei der die Viabilität nicht durch Ethanol herabgesetzt wurde.

### 5.3 Kombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt

In dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt die Migration von Fibroblasten positiv beeinflussen können. Im Vergleich zu unbehandelten menschlichen Fibroblasten, die die Lücke im Scratch-Test nach 240 h nicht vollständig schlossen, führte die *Aloe vera*-Behandlung zu einem vollständigen Lückenschluss. *Aloe vera* konnte die Migration bei einer hohen Konzentration von 2.000 µg/ml beschleunigen, was mit früheren Studien übereinstimmt (145, 181). Überraschenderweise führte die Behandlung mit 2 mg/l Rhabarberwurzelextrakt oder einer Kombination aus 2 mg/l Rhabarberwurzelextrakt und 500 g/ml *Aloe vera*-Extrakt innerhalb von 96 bis 120 h zu einer nahezu vollständigen Schließung von mehr als 90% der *Scratch*-Fläche. Im Vergleich zur Kontrolle beschleunigte die Kombination der Extrakte die Schließung der Lücke um das 2,5-fache. Dieser beschriebene Synergismus der Kombination der Pflanzenextrakte wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Trotz einer erhöhten Migration wurde keine signifikante Erhöhung der Proliferation von Fibroblasten festgestellt. Die Tatsache, dass die Kombination der beiden untersuchten Substanzen wahrscheinlich nicht in der Lage ist, eine übermäßige Fibroblastenproliferation im Rahmen einer Fibrose zu induzieren, ist eine wichtige Information aus diesem Wundheilungsexperiment (188, 189).

Die Zellzyklusanalyse sowie die Phalloidin-Färbung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die Ursache der synergistischen Wirkung der Pflanzenextrakte auf die Fibroblastenmigration ist bisher ungeklärt, jedoch gibt es Erklärungsansätze. Die AG nahm an, dass Acemannan das wichtigste bioaktive Polysaccharid für die synergistische Wirkung ist. Es wird angenommen, dass Acemannan, eine 1,4-acetylierte wasserlösliche Polymannose,

biologische Reaktionen beeinflusst (190, 191). Durch Acemannan stieg die Proliferation von gingivalen Fibroblasten *in vitro* an. Eine Erhöhung der Expression von Interleukin-6 und -8 dieser mit Acemannan behandelten Fibroblasten könnte darauf hinweisen, dass diese als lokale Abwehrzellen fungieren (192). Acemannan erhöhte außerdem die Fibroblastenproliferation bei männlichen Ratten und stimulierte die Expression von *keratinocyte growth factor-1* (KGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Kollagen Typ I, was auf eine verbesserte Wundheilung hindeutet (193).

In einer anderen *in vivo* Studie erhöhte Acemannan die Mineralisierung, die Expression von Osteopontin und Knochensialoprotein, die Aktivität der alkalischen Phosphatase, die Proliferation von Stromazellen des Knochenmarks VEGF und BMP-2 bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten (194). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Acemannan einen Beitrag zur Wundheilung von oralem Weich- und Hartgewebe leisten kann. Dazu müssten weitere Studien durchgeführt werden, um die genauen molekularen Mechanismen zu verstehen. Es besteht also die Möglichkeit, dass Acemannan in *Aloe vera* mit einem Inhaltsstoff der Rhabarberwurzel interagiert. Die genauere Charakterisierung von Rhabarberwurzelextrakt in zukünftigen Forschungsarbeiten könnte erklären, wie die synergistische Wirkung zwischen *Aloe vera* und Rhabarberwurzel zustande kommt. So könnten auch Rückschlüsse auf den genauen Mechanismus gezogen werden.

Zudem findet sich laut Literatur das Anthrachinon Emodin in beiden Extrakten (138, 149, 150, 156). Dies könnte im Zusammenhang mit der Synergie stehen, indem sich die Inhaltsstoffe gegenseitig intensivieren.

Zusätzlich ergab durch weitere Versuche der AG, dass die Kombination auch in Bezug auf die antimikrobielle Aktivität eine Synergie aufwies (143).

Die Kombination aus Rhabarberwurzelextrakt und *Aloe vera* wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Dennoch wurden andere Pflanzenextraktkombinationen mit gemeinsamen positiven Effekten bereits in der Literatur beschrieben. *Lee et al.* stellten einen synergistischen Effekt von Extrakten aus der Honoki-Magnolie (*Magnolia obovata*) und dem japanischen Geißblatt (*Lonicera japonica*) dar. Dieser zeigte sich in der Aktivität gegen *S. aureus*, *C. albicans* und *Bacillus subtilis* (195). Sogar bei drei Pflanzenextrakten konnte eine Synergie im Schutz der Magenschleimhaut nachgewiesen werden: Igel-Stachelbart (*Herichium erinaceus*), indischer Wassernabel (*Centella asiatica*) und *Amomum villosum* konnten

gemeinsam die Bildung von Magengeschwüren hemmen (196). Synergien unter Pflanzenextrakten sind noch nicht umfangreich erforscht und die genaue Erklärung auf zellulärer und molekularer Ebene fehlt bislang.

Die Kombination der Extrakte aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel könnte eine neuartige Möglichkeit sein, die Wundheilung zu verbessern.

Allerdings fehlen bisher klinische Studien: die Kombination wurde bisher weder *in vivo* noch klinisch erforscht. Dadurch können auch etwaige Nebenwirkungen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eingeschätzt werden. Eine klinische Studie wäre in der Zukunft also eine gute Möglichkeit, die Kombination weiter zu erproben.

#### 5.4 Diskussion der Methoden

In dieser Dissertation wurden für die Versuche primäre, menschliche Fibroblasten und keine Zelllinien verwendet. Bei den Versuchen zeigten sich teilweise hohe Standardabweichungen, da die Reaktionen der Zellen aus unterschiedlichen Patienten auf die Behandlung unterschiedlich waren. Insbesondere bei *Aloe vera*-Konzentrationen von mehr als 1000 µg/ml (Abb. 4 und Abb. 9B) konnte dies beobachtet werden.

Außerdem waren die Auswirkungen von *Aloe vera*, Rhabarberwurzelextrakt und der Kombination auf die Fibroblastenmigration in verschiedenen Durchgängen mit unterschiedlichen Fibroblasten unterschiedlich. Unter Zuhilfenahme einer größeren Stichprobenanzahl und der Analyse der Ergebnisse im Zusammenhang mit Patientendaten und Vorerkrankungen könnten die Ergebnisse ggf. weiter spezifiziert werden. Aufgrund des experimentellen Aufbaus dieser Laborstudie und des fehlenden Ethikvotums zur Analyse der Patientendaten konnten die Ursache-Wirkungs-Beziehungen und Kausalitäten nicht analysiert werden. Dies sind jedoch Themen, die in zukünftigen Studien betrachtet werden könnten.

Die in dieser Dissertation priorisierten Fibroblasten sind jedoch nicht die einzige für die Wundheilung relevanten Zellart. Daher könnten hier in weiteren Versuchen beispielsweise Endothelzellen in Betracht gezogen werden. Hier wäre die Zytotoxizität der Pflanzenextrakte auf Endothelzellen interessant.

Die Färbung der Aktin-Fasern der Fibroblasten mit Phalloidin zeigte keine veränderte Aktin-Verteilung als Reaktion auf *Aloe vera*-Extrakt und Rhabarberwurzelextrakt. Die Färbung wurde nur einmal mit stationären Zellen durchgeführt. Als Reaktion auf die Behandlung mit der Kombination der Pflanzenextrakte hätte eine Färbung der Zellen

während der Migration und der Schließung des ursprünglich zellfreien Bereichs im *Scratch*-Test Unterschiede im Aktinnetzwerk eventuell besser zeigen können. Dass das Aktinnetzwerk eine wichtige Rolle in der Zellmigration spielt, ist bereits bekannt. Es baut sich während der Migration um. Allerdings sind diese Vorgänge noch nicht vollständig geklärt (197). Es wäre denkbar in zukünftigen Untersuchungen neben Aktin auch andere Proteine des Skelettsystems zu untersuchen. Außerdem wäre eine dreidimensionale Darstellung des Zytoskeletts informativ.

## 5.5 Klinischer Ausblick

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit zeigen ein therapeutisches Potenzial für die Pflanzenextraktkombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel im Bereich der oralen Wundheilung.

Denkbar ist etwa eine Mundspüllösung, die *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt enthält. Hier können nicht nur die genannten Effekte der verbesserten Wundheilung auftreten, sondern die Mundspülung könnte weitere positive Auswirkungen auf die Mundhöhle haben. Ein Beispiel hierfür ist das enthaltene *Aloe vera*, welches gegen Karies-Bakterien wirken kann (141, 142). Zusätzlich kann die Remineralisation des Schmelzes gestärkt werden (134).

Denkbar für die Zukunft wäre außerdem ein Produkt in Form eines Gels. Dieses könnte man auf das Zahnfleisch auftragen oder direkt in die Parodontaltaschen einbringen. So könnten die Pflanzenextrakte für eine längere Zeit am Ort der Entzündung wirken und somit die Wundheilung direkt beschleunigen und pathogene Erreger wie *P. gingivalis* hemmen. Auch bei einer Periimplantitis-Erkrankung ist dies denkbar.

Besonders bei Patienten mit einer Parodontitis-Erkrankung könnte die Kombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt therapieunterstützend wirken. Hier spielt die Wundheilung eine Rolle, welche durch die Kombination bereits verbessert werden kann. Hinzu kommt die synergistische, hemmende antimikrobielle Aktivität gegen *P. gingivalis*. Zusätzlich wurde in der Literatur eine biofilmreduzierende Wirkung von *Aloe vera* beschrieben (126, 127) Dadurch könnte die Erkrankung potenziell auf mehreren Wegen bekämpft werden. Auch bei *Diabetes mellitus*-Patienten in Kombination mit Parodontitis ist die Anwendung denkbar.

Zudem ist eine Mundspülung oder ein Gel für die Anwendung auf der Mundschleimhaut von Tumorpatienten denkbar. Hier könnten Nebenwirkungen bei

Chemo- oder Strahlentherapie gemildert werden. Dasselbe Produkt wäre ebenfalls bei Patienten mit OLP oder oraler Mukositis geeignet.

## 6 Zusammenfassung

Durch zahlreiche Faktoren und Erkrankungen kann es zu Wundheilungsstörungen im Bereich der oralen Schleimhaut kommen. Gängige Präparate, die zur Therapie herangezogen werden, wirken zwar antiseptisch, bergen aber auch Nebenwirkungen wie z.B. Zytotoxizität.

Ziel dieser Dissertation war es, pflanzliche Substanzen zu finden, die für die orale topische Anwendung bei Patienten mit beeinträchtigter Mundschleimhaut-Wundheilung geeignet sind. *Aloe vera* ist vor allem für Regenerationsfähigkeit und Rhabarberwurzelextrakt für die antibakterielle Wirkung bekannt. Daher wurden diese beiden Pflanzenextrakte für die Versuche dieser Dissertation herangezogen.

Dafür wurden verschiedene *in vitro*-Versuche durchgeführt. Zunächst wurde die Zellproliferation mithilfe eines Viabilitätsassays untersucht. Weder *Aloe vera* noch Rhabarberwurzelextrakt konnte die Viabilität von Fibroblasten signifikant erhöhen. Anschließend wurde die Migration mithilfe des *Scratch-Assays* analysiert: die beiden Extrakte wiesen hier einen synergistischen Effekt auf. Zusammen konnten sie den Spaltschluss beschleunigen und damit die Fibroblastenmigration statistisch signifikant verbessern. Zur weiteren Untersuchung wurde eine Zellzyklusanalyse sowie eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Dadurch stellte sich heraus, dass weder der Zellzyklus noch das Zytoskelett durch die Pflanzenextraktkombination verändert wurde.

Somit konnte die Hypothese dieser Dissertationsarbeit bestätigt werden. Diese lautete, dass die Verwendung der zwei Pflanzenextrakte in der Therapie oraler Wundheilungsstörungen denkbar ist. Eine Synergie der Extrakte aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzel wurde erstmals beschrieben und stellt damit eine neuartige Therapieoption dar.

Für Mundschleimhauterkrankungen oder orale Wundheilungsstörungen könnte die Pflanzenextraktkombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt klinisch in Form eines Gels oder einer Mundspüllösung einen heilenden Effekt erzielen. Klinische Studien stehen diesbezüglich noch aus.

In Anbetracht der vielversprechenden Ergebnisse eröffnet die Kombination aus *Aloe vera* und Rhabarberwurzelextrakt eine neue Perspektive für die Behandlung oraler Wundheilungsstörungen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(12):2059-81.
2. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014;41 Suppl 15:S6-22.
3. Politis C, Schoenaers J, Jacobs R, Agbaje JO. Wound Healing Problems in the Mouth. *Front Physiol.* 2016;7:507.
4. Chiquet M, Katsaros C, Kletsas D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):21-40.
5. Addy M, Wright R. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of providone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 1978;5(3):198-205.
6. Rueda-Fernández M, Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, de Luna-Bertos E, Ruiz C, Ramos-Torrecillas J, et al. Effect of the most common wound antiseptics on human skin fibroblasts. *Clin Exp Dermatol.* 2022;47(8):1543-9.
7. Hekmatpou D, Mehrabi F, Rahzani K, Aminiyan A. The Effect of *Aloe vera* Clinical Trials on Prevention and Healing of Skin Wound: A Systematic Review. *Iran J Med Sci.* 2019;44(1):1-9.
8. Burusapat C, Supawan M, Pruksapong C, Pitiseree A, Suwantemee C. Topical *Aloe vera* Gel for Accelerated Wound Healing of Split-Thickness Skin Graft Donor Sites: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial and Systematic Review. *Plast Reconstr Surg.* 2018;142(1):217-26.
9. Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological Update Properties of *Aloe vera* and its Major Active Constituents. *Molecules.* 2020;25(6).
10. Müller-Heupt LK, Vierengel N, Groß J, Opatz T, Deschner J, von Loewenich FD. Antimicrobial Activity of *Eucalyptus globulus*, *Azadirachta indica*, *Glycyrrhiza glabra*, *Rheum palmatum* Extracts and Rhein against *Porphyromonas gingivalis*. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(2).
11. Liao J, Zhao L, Yoshioka M, Hinode D, Grenier D. Effects of Japanese traditional herbal medicines (Kampo) on growth and virulence properties of *Porphyromonas gingivalis* and viability of oral epithelial cells. *Pharm Biol.* 2013;51(12):1538-44.
12. Kommerein N, Vierengel N, Groß J, Opatz T, Al-Nawas B, Müller-Heupt LK. Antiplanktonic and Antibiofilm Activity of *Rheum palmatum* against *Streptococcus oralis* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microorganisms.* 2022;10(5).
13. Zhang ZH, Wei F, Vaziri ND, Cheng XL, Bai X, Lin RC, et al. Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis. *Sci Rep.* 2015;5:14472.
14. Ibrahim EABDE-B, F. Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Rhubarb Roots Extract. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2016;39(2):93-9.
15. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-42.
16. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):a023267.
17. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2000;13(2 Suppl):6-11.

18. Dickinson DP, Coleman BG, Batrice N, Lee J, Koli K, Pennington C, et al. Events of wound healing/regeneration in the canine supraalveolar periodontal defect model. *J Clin Periodontol.* 2013;40(5):527-41.
19. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665-706.
20. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
21. Phillipson M, Kubes P. The Healing Power of Neutrophils. *Trends Immunol.* 2019;40(7):635-47.
22. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74.
23. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-21.
24. Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *Faseb j.* 2005;19(11):1561-3.
25. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):998-1008.
26. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016;142:56-70.
27. Desmoulière A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(1):19-30.
28. Lovvorn HN, 3rd, Cheung DT, Nimni ME, Perelman N, Estes JM, Adzick NS. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg.* 1999;34(1):218-23.
29. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301-11.
30. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(4):225-34.
31. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003;90(6):993-1002.
32. Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability.* 2011;20(4):108-20.
33. Forrest L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br J Surg.* 1983;70(3):133-40.
34. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013;22(8):407-8, 10-12.
35. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010;341(1):126-40.
36. Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(7):1364-72.
37. Woods A, Couchman JR. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 1998;8(5):189-92.
38. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(5):728-35.

39. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(2):638-47.
40. Trebault A, Chan EK, Midwood KS. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 4):695-7.
41. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 2007;179(6):1311-23.
42. Sun C, Tian X, Jia Y, Yang M, Li Y, Fernig DG. Functions of exogenous FGF signals in regulation of fibroblast to myofibroblast differentiation and extracellular matrix protein expression. *Open Biol.* 2022;12(9):210356.
43. Honda E, Park AM, Yoshida K, Tabuchi M, Munakata H. Myofibroblasts: Biochemical and proteomic approaches to fibrosis. *Tohoku J Exp Med.* 2013;230(2):67-73.
44. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43(1):146-55.
45. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):666-71.
46. Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH. Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen.* 2013;21(5):648-60.
47. Evans EW. Treating Scars on the Oral Mucosa. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(1):89-97.
48. Wong JW, Gallant-Behm C, Wiebe C, Mak K, Hart DA, Larjava H, et al. Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound Repair Regen.* 2009;17(5):717-29.
49. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The Bigger Picture: Why Oral Mucosa Heals Better Than Skin. *Biomolecules.* 2021;11(8).
50. Gibbs S, Ponc M. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol.* 2000;45(2):149-58.
51. Funato N, Moriyama K, Baba Y, Kuroda T. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *J Dent Res.* 1999;78(9):1511-7.
52. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res.* 2003;82(8):621-6.
53. Healey N. The mouth's curative superpowers. *Nature.* 2021.
54. Rodriguez-Merchan EC. Surgical wound healing in bleeding disorders. *Haemophilia.* 2012;18(4):487-90.
55. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
56. Salvi GE, Zitzmann NU. The effects of anti-infective preventive measures on the occurrence of biologic implant complications and implant loss: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29 Suppl:292-307.
57. Schwarz F, Ramanauskaite A. It is all about peri-implant tissue health. *Periodontol* 2000. 2022;88(1):9-12.
58. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):282-5.
59. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:178-81.

60. Diaz P, Gonzalo E, Villagra LJG, Miegimolle B, Suarez MJ. What is the prevalence of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2022;22(1):449.
61. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* (1930). 1965;36:177-87.
62. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1986;13(5):345-59.
63. Greene JC. Oral hygiene and periodontal disease. *Am J Public Health Nations Health*. 1963;53(6):913-22.
64. Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. [Periodontitis-therapy of a widespread disease]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2021;64(8):931-40.
65. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):26-39.
66. Yilmaz Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology (Reading)*. 2008;154(Pt 10):2897-903.
67. Bhattacharya R, Xu F, Dong G, Li S, Tian C, Ponugoti B, et al. Effect of bacteria on the wound healing behavior of oral epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e89475.
68. Laheij AM, van Loveren C, Deng D, de Soet JJ. The impact of virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* on wound healing in vitro. *J Oral Microbiol*. 2015;7:27543.
69. Song LT, Tada H, Nishioka T, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, et al. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains-Mediated Degradation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Leads to Delayed Wound Healing Responses in Human Endothelial Cells. *J Innate Immun*. 2022;14(4):306-19.
70. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg*. 2004;28(3):321-6.
71. Karamanos E, Osgood G, Siddiqui A, Rubinfeld I. Wound healing in plastic surgery: does age matter? An American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program study. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(3):876-81.
72. Wilson JA, Clark JJ. Obesity: Impediment to Postsurgical Wound Healing. *Advances in Skin & Wound Care*. 2004;17(8):426-32.
73. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
74. Klein S, Gastaldelli A, Yki-Järvinen H, Scherer PE. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metab*. 2022;34(1):11-20.
75. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
76. Roy S, Das A, Sen CK. Disorder of Localized Inflammation in Wound Healing: A Systems Perspective. In: Vodovotz Y, An G, editors. *Complex Systems and Computational Biology Approaches to Acute Inflammation*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 173-83.
77. Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, Li SS, Zhang BW, Chen W, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):204.
78. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2009;36(9):765-74.
79. Kapp JM, Boren SA, Yun S, LeMaster J. Diabetes and tooth loss in a national sample of dentate adults reporting annual dental visits. *Prev Chronic Dis*. 2007;4(3):A59.
80. Wang AS, Armstrong EJ, Armstrong AW. Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. *Am J Surg*. 2013;206(3):410-7.

81. Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radek KA, Jones MK, et al. Alcohol exposure and mechanisms of tissue injury and repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(3):392-9.
82. Sørensen LT. Wound healing and infection in surgery: the pathophysiological impact of smoking, smoking cessation, and nicotine replacement therapy: a systematic review. *Ann Surg*. 2012;255(6):1069-79.
83. Dietrich E, Antoniadou K. Molecularly targeted drugs for the treatment of cancer: oral complications and pathophysiology. *Hippokratia*. 2012;16(3):196-9.
84. Dunda SE, Bozkurt A, Pallua N, Krapohl BD. Reconstructive surgery in immunocompromised patients: evaluation and therapy. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2015;4:Doc18.
85. Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(10):1123-31.
86. Xu H, Dongari-Bagtzoglou A. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Curr Opin Microbiol*. 2015;26:65-70.
87. Bertolini M, Ranjan A, Thompson A, Diaz PI, Sobue T, Maas K, et al. *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):e1007717.
88. Lam OL, McGrath C, Bandara HM, Li LS, Samaranayake LP. Oral health promotion interventions on oral reservoirs of *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Oral Dis*. 2012;18(3):244-54.
89. Roy S, Santra S, Das A, Dixith S, Sinha M, Ghatak S, et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection Compromises Wound Healing by Causing Deficiencies in Granulation Tissue Collagen. *Ann Surg*. 2020;271(6):1174-85.
90. Lu R, Zhang J, Sun W, Du G, Zhou G. Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: an overview. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(1):1-14.
91. Halonen P, Jakobsson M, Heikinheimo O, Riska A, Gissler M, Pukkala E. Cancer risk of Lichen planus: A cohort study of 13,100 women in Finland. *Int J Cancer*. 2018;142(1):18-22.
92. Le Cleach L, Chosidow O. Clinical practice. Lichen planus. *N Engl J Med*. 2012;366(8):723-32.
93. Shen ZY, Liu W, Zhu LK, Feng JQ, Tang GY, Zhou ZT. A retrospective clinicopathological study on oral lichen planus and malignant transformation: analysis of 518 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6):e943-7.
94. Gürgan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E. Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study. *J Periodontol*. 2006;77(3):370-84.
95. Krishnamoorthy G, Narayana A, Balkrishnan D. Chlorhexidine for the Treatment of Peri-Implantitis: Is it a Benison? *J Long Term Eff Med Implants*. 2022;32(1):19-23.
96. Kasaj A, Heib A, Willershausen B. Effectiveness of a topical salve (Dynexan) on pain sensitivity and early wound healing following nonsurgical periodontal therapy. *Eur J Med Res*. 2007;12(5):196-9.
97. Feres M, Figueiredo LC, Soares GM, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):131-86.
98. Levy SB. *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*: Springer; 2013.

99. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002;346(5):334-9.
100. Ortega KL, Rezende NP, Araújo NS, Magalhães MH. Effect of a topical antimicrobial paste on healing after extraction of molars in HIV positive patients: randomised controlled clinical trial. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(1):27-9.
101. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(1):1-15; quiz 6-8.
102. Tyldesley WR, Harding SM. Betamethasone valerate aerosol in the treatment of oral lichen planus. *Br J Dermatol.* 1977;96(6):659-62.
103. Lodi G, Manfredi M, Mercadante V, Murphy R, Carrozzo M. Interventions for treating oral lichen planus: corticosteroid therapies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;2(2):Cd001168.
104. Rastogi M, Khurana R, Revannasiddaiah S, Jaiswal I, Nanda SS, Gupta P, et al. Role of benzydamine hydrochloride in the prevention of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy (>50 Gy) with or without chemotherapy. *Support Care Cancer.* 2017;25(5):1439-43.
105. Kin-Fong Cheng K, Ka Tsui Yuen J. A pilot study of chlorhexidine and benzydamine oral rinses for the prevention and treatment of irradiation mucositis in patients with head and neck cancer. *Cancer Nurs.* 2006;29(5):423-30.
106. Kazemian A, Kamian S, Aghili M, Hashemi FA, Haddad P. Benzydamine for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis in head and neck cancers: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2009;18(2):174-8.
107. Roopashri G, Jayanthi K, Guruprasad R. Efficacy of benzydamine hydrochloride, chlorhexidine, and povidone iodine in the treatment of oral mucositis among patients undergoing radiotherapy in head and neck malignancies: A drug trail. *Contemp Clin Dent.* 2011;2(1):8-12.
108. Epstein JB, Silverman S, Jr., Paggiarino DA, Crockett S, Schubert MM, Senzer NN, et al. Benzydamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Cancer.* 2001;92(4):875-85.
109. Daugėlaitė G, Užkuraitytė K, Jagelavičienė E, Filipauskas A. Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(2).
110. Sezgin Y, Bilgin Çetin M, Bulut Ş, Alptekin N, Börçek P. Evaluating the Effects of a Topical Preparation with Dexpanthenol, Silbiol, Undecylenic Acid, and Lidocaine on Palatal Mucosa Wound Healing in a Rat Model. *Balkan Med J.* 2019;36(2):88-95.
111. Priprem A, Damrongrungruang T, Limsitthichaikoon S, Khampaenjiraroach B, Nukulkit C, Thapphasaraphong S, et al. Topical Niosome Gel Containing an Anthocyanin Complex: a Potential Oral Wound Healing in Rats. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(4):1681-92.
112. Toma AI, Fuller JM, Willett NJ, Goudy SL. Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Transl Res.* 2021;236:17-34.
113. Heggors JP, Kucukcelebi A, Listengarten D, Stabenau J, Ko F, Broemeling LD, et al. Beneficial effect of *Aloe* on wound healing in an excisional wound model. *J Altern Complement Med.* 1996;2(2):271-7.
114. Fulton JE, Jr. The stimulation of postdermabrasion wound healing with stabilized *Aloe vera* gel-polyethylene oxide dressing. *J Dermatol Surg Oncol.* 1990;16(5):460-7.
115. Hutter JA, Salman M, Stavinoha WB, Satsangi N, Williams RF, Streeper RT, et al. Antiinflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *J Nat Prod.* 1996;59(5):541-3.

116. Ali F, Wajid N, Sarwar MG, Qazi AM. Oral Administration of *Aloe vera* Ameliorates Wound Healing through Improved Angiogenesis and chemotaxis in Sprague Dawley Rats. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021;22(8):1122-8.
117. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. *Indian J Exp Biol*. 1998;36(9):896-901.
118. Nejaim Y, A IVS, T VV, E JNLS, S MdA. Evaluation of radioprotective effect of *Aloe vera* and zinc/copper compounds against salivary dysfunction in irradiated rats. *J Oral Sci*. 2014;56(3):191-4.
119. Saini DK, Saini MR. Evaluation of radioprotective efficacy and possible mechanism of action of *Aloe gel*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;31(3):427-35.
120. Dörr W, Schlichting S, Bray MA, Flockhart IR, Hopewell JW. Effects of dexpanthenol with or without *Aloe vera* extract on radiation-induced oral mucositis: preclinical studies. *Int J Radiat Biol*. 2005;81(3):243-50.
121. Sahebjamee M, Mansourian A, Hajimirzamohammad M, Zadeh MT, Bekhradi R, Kazemian A, et al. Comparative Efficacy of *Aloe vera* and Benzzydamine Mouthwashes on Radiation-induced Oral Mucositis: A Triple-blind, Randomised, Controlled Clinical Trial. *Oral Health Prev Dent*. 2015;13(4):309-15.
122. Mansouri P, Haghghi M, Beheshtipour N, Ramzi M. The Effect of *Aloe vera* Solution on Chemotherapy-Induced Stomatitis in Clients with Lymphoma and Leukemia: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Community Based Nurs Midwifery*. 2016;4(2):119-26.
123. Anuradha A, Patil B, Asha VR. Evaluation of efficacy of *Aloe vera* in the treatment of oral submucous fibrosis - a clinical study. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(1):50-5.
124. Singh N, Hebbale M, Mhapuskar A, UI Nisa S, Thopte S, Singh S. Effectiveness of *Aloe vera* and Antioxidant along with Physiotherapy in the Management of Oral Submucous Fibrosis. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17(1):78-84.
125. Bhatt G, Gupta S, Ghosh S. Comparative efficacy of topical *Aloe vera* and low-level laser therapy in the management of oral lichen planus: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2022;37(3):2063-70.
126. Gupta RK, Gupta D, Bhaskar DJ, Yadav A, Obaid K, Mishra S. Preliminary antiplaque efficacy of *Aloe vera* mouthwash on 4 day plaque re-growth model: randomized control trial. *Ethiop J Health Sci*. 2014;24(2):139-44.
127. Vangipuram S, Jha A, Bhashyam M. Comparative efficacy of *Aloe vera* mouthwash and chlorhexidine on periodontal health: A randomized controlled trial. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(4):e442-e7.
128. Yeturu SK, Acharya S, Urala AS, Pentapati KC. Effect of *Aloe vera*, chlorine dioxide, and chlorhexidine mouth rinses on plaque and gingivitis: A randomized controlled trial. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016;6(1):54-8.
129. Ipshita S, Kurian IG, Dileep P, Kumar S, Singh P, Pradeep AR. One percent alendronate and *Aloe vera* gel local host modulating agents in chronic periodontitis patients with class II furcation defects: A randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(3):e12334.
130. Kurian IG, Dileep P, Ipshita S, Pradeep AR. Comparative evaluation of subgingivally-delivered 1% metformin and Agel in the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis patients: A randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(3):e12324.
131. Pradeep AR, Garg V, Raju A, Singh P. Adjunctive Local Delivery of *Aloe vera* Gel in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2016;87(3):268-74.

132. Ashouri Moghaddam A, Radafshar G, Jahandideh Y, Kakaei N. Clinical Evaluation of Effects of Local Application of *Aloe vera* Gel as an Adjunct to Scaling and Root Planning in Patients with Chronic Periodontitis. *J Dent (Shiraz)*. 2017;18(3):165-72.
133. Sholehvar F, Mehrabani D, Yaghmaei P, Vahdati A. The effect of *Aloe vera* gel on viability of dental pulp stem cells. *Dent Traumatol*. 2016;32(5):390-6.
134. Yikici C, Ozcan S. Remineralization activities of toothpastes with and without *Aloe vera* with different ratios of fluoride on demineralized enamel: An In-vitro study. *Niger J Clin Pract*. 2022;25(9):1563-70.
135. Nimma VL, Talla HV, Bairi JK, Gopaldas M, Bathula H, Vangdoth S. Holistic Healing Through Herbs: Effectiveness of *Aloe vera* on Post Extraction Socket Healing. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(3):Zc83-zc6.
136. Nabila VK, Putra IB. The effect of *Aloe vera* ethanol extract on the growth inhibition of *Candida albicans*. *Med Glas (Zenica)*. 2020;17(2):485-9.
137. Doddanna SJ, Patel S, Sundarrao MA, Veerabhadrapa RS. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2013;24(4):401-5.
138. Robson MC, Hegggers JP, Hagstrom WJ. Myth, magic, witchcraft, or fact? *Aloe vera* revisited. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*. 1982;3(3):157-63.
139. Saddiq AA, Al-Ghamdi H. *Aloe vera* extract: A novel antimicrobial and antibiofilm against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Pak J Pharm Sci*. 2018;31(5(Supplementary)):2123-30.
140. Jain S, Rathod N, Nagi R, Sur J, Laheji A, Gupta N, et al. Antibacterial Effect of *Aloe vera* Gel against Oral Pathogens: An In-vitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(11):Zc41-zc4.
141. Prabhakar AR, Karuna YM, Yavagal C, Deepak BM. Cavity disinfection in minimally invasive dentistry - comparative evaluation of *Aloe vera* and propolis: A randomized clinical trial. *Contemp Clin Dent*. 2015;6(Suppl 1):S24-31.
142. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of *Aloe vera* gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci*. 2012;54(1):15-21.
143. Müller-Heupt LK, Wiesmann N, Schröder S, Korkmaz Y, Vierengel N, Groß J, et al. Extracts of *Rheum palmatum* and *Aloe vera* Show Beneficial Properties for the Synergistic Improvement of Oral Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2022;14(10).
144. Brasher WJ, Zimmermann ER, Collings CK. The effects of prednisolone, indomethacin, and *Aloe vera* gel on tissue culture cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969;27(1):122-8.
145. Teplicki E, Ma Q, Castillo DE, Zarei M, Hustad AP, Chen J, et al. The Effects of *Aloe vera* on Wound Healing in Cell Proliferation, Migration, and Viability. *Wounds*. 2018;30(9):263-8.
146. Lee M-J, Yoon S-H, Lee S-K, Chung M-H, Park Y-I, Sung C-K, et al. In vivo angiogenic activity of dichloromethane extracts of *Aloe vera* gel. *Archives of Pharmacal Research*. 1995;18:332-5.
147. Hamman JH. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules*. 2008;13(8):1599-616.
148. Liu C, Cui Y, Pi F, Cheng Y, Guo Y, Qian H. Extraction, Purification, Structural Characteristics, Biological Activities and Pharmacological Applications of Acemannan, a Polysaccharide from *Aloe vera*: A Review. *Molecules*. 2019;24(8).
149. Reynolds T. *Aloes: the genus Aloe*: CRC press; 2004.
150. Shelton RM. *Aloe vera*. Its chemical and therapeutic properties. *Int J Dermatol*. 1991;30(10):679-83.

151. Songsiripradubboon S, Kladkaew S, Trairatvorakul C, Sangvanich P, Soontornvipart K, Banlunara W, et al. Stimulation of Dentin Regeneration by Using Acemannan in Teeth with Lipopolysaccharide-induced Pulp Inflammation. *J Endod.* 2017;43(7):1097-103.
152. Harima S, Matsuda H, Kubo M. Study of various rhubarbs regarding the cathartic effect and endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 1994;17(11):1522-5.
153. Xiao P, He L, Wang L. Ethnopharmacologic study of Chinese rhubarb. *Journal of Ethnopharmacology.* 1984;10(3):275-93.
154. Ye M, Han J, Chen H, Zheng J, Guo D. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007;18(1):82-91.
155. Tan L, Geng DD, Hu FZ, Dong Q. Rapid Identification and Quantification of Natural Antioxidants in the Seeds of Rhubarb from Different Habitats in China Using Accelerated Solvent Extraction and HPLC-DAD-ESI-MSn-DPPH Assay. *J Chromatogr Sci.* 2016;54(1):48-57.
156. Wang JB, Zhao HP, Zhao YL, Jin C, Liu DJ, Kong WJ, et al. Hepatotoxicity or hepatoprotection? Pattern recognition for the paradoxical effect of the Chinese herb *Rheum palmatum L.* in treating rat liver injury. *PLoS One.* 2011;6(9):e24498.
157. Nanasombat S, Kuncharoen N, Ritcharoon B, Sukcharoen P. Antibacterial activity of thai medicinal plant extracts against oral and gastrointestinal pathogenic bacteria and prebiotic effect on the growth of *lactobacillus acidophilus*. *Chiang Mai J Sci.* 2018;45(1):33-44.
158. Yan X, Gu S, Shi Y, Cui X, Wen S, Ge J. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. *Arch Microbiol.* 2017;199(9):1267-75.
159. Ban SH, Kwon YR, Pandit S, Lee YS, Yi HK, Jeon JG. Effects of a bio-assay guided fraction from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, acid production and glucosyltransferase of *mutans streptococci*. *Fitoterapia.* 2010;81(1):30-4.
160. Xu JS, Cui Y, Liao XM, Tan XB, Cao X. Effect of emodin on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and the development of caries in rats. *Exp Ther Med.* 2014;8(4):1308-12.
161. Yang M, Shrestha SK, Soh Y, Heo SM. Effects of aloe-emodin on alveolar bone in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis rat model: a pilot study. *J Periodontal Implant Sci.* 2022;52(5):383-93.
162. Li YL, Li YF, Zhou YZ, Yang JY, Ran X. [The curative effect of rhubarb extract on severe periodontitis in patients with diabetes mellitus]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2018;27(6):633-6.
163. Shojaei Shad F, Haghghi MJ. Study of the effect of the essential oil (extract) of rhubarb stem (shoot) on glycosylated hemoglobin and fasting blood glucose levels in patients with type II diabetes. *Biomedicine (Taipei).* 2018;8(4):24.
164. Deng T, Du J, Yin Y, Cao B, Wang Z, Zhang Z, et al. Rhein for treating diabetes mellitus: A pharmacological and mechanistic overview. *Front Pharmacol.* 2022;13:1106260.
165. Chen C, Lin Z, Liu W, Hu Q, Wang J, Zhuang X, et al. Emodin accelerates diabetic wound healing by promoting anti-inflammatory macrophage polarization. *Eur J Pharmacol.* 2022;936:175329.
166. Ni W, Wang N, Tian S, Xu Q. Antinociceptive effects of emodin on CFA-induced inflammatory pain in rats. *Natural Product Communications.* 2020;15(7):1934578X20942002.

167. Zhang X, Li J, Guan L. Emodin reduces inflammatory and nociceptive responses in different pain and inflammation-induced mouse models. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2022.
168. Huang PH, Huang CY, Chen MC, Lee YT, Yue CH, Wang HY, et al. Emodin and Aloe-Emodin Suppress Breast Cancer Cell Proliferation through ER  $\alpha$  Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:376123.
169. Zhou RS, Wang XW, Sun QF, Ye ZJ, Liu JW, Zhou DH, et al. Anticancer Effects of Emodin on HepG2 Cell: Evidence from Bioinformatic Analysis. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3065818.
170. Guo H, Liu F, Yang S, Xue T. Emodin alleviates gemcitabine resistance in pancreatic cancer by inhibiting MDR1/P-glycoprotein and MRPs expression. *Oncol Lett*. 2020;20(5):167.
171. Teng X, Wang SY, Shi YQ, Fan XF, Liu S, Xing Y, et al. The role of emodin on cisplatin resistance reversal of lung adenocarcinoma A549/DDP cell. *Anticancer Drugs*. 2021;32(9):939-49.
172. Wang Z, Chen H, Chen J, Hong Z, Liao Y, Zhang Q, et al. Emodin sensitizes human pancreatic cancer cells to EGFR inhibitor through suppressing Stat3 signaling pathway. *Cancer Manag Res*. 2019;11:8463-73.
173. Yang N, Li C, Li H, Liu M, Cai X, Cao F, et al. Emodin Induced SREBP1-Dependent and SREBP1-Independent Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Front Pharmacol*. 2019;10:709.
174. Liu Z, Ma N, Zhong Y, Yang ZQ. Antiviral effect of emodin from *Rheum palmatum* against coxsackievirus B5 and human respiratory syncytial virus in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2015;35(6):916-22.
175. Saller R, Büechi S, Meyrat R, Schmidhauser C. Combined herbal preparation for topical treatment of Herpes labialis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2001;8(6):373-82.
176. Liu C, Liu J, Zheng Y, Qu J, Yang W, Tang X, et al. Subchronic oral toxicity study of rhubarb extract in Sprague-Dawley rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;123:104921.
177. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):12347-60.
178. Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33.
179. Nair A, Manohar SM. A flow cytometric journey into cell cycle analysis. *Bioanalysis*. 2021;13(21):1627-44.
180. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
181. Shafaie S, Andalib S, Shafaie H, Montaseri A, Tavakolizadeh M. Differential Biological Behavior of Fibroblasts and Endothelial Cells under *Aloe vera* Gel Culturing. *Int J Mol Cell Med*. 2020;9(3):234-46.
182. Mandrioli R, Mercolini L, Ferranti A, Fanali S, Raggi MA. Determination of aloe emodin in *Aloe vera* extracts and commercial formulations by HPLC with tandem UV absorption and fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2011;126(1):387-93.
183. Zhang J, Wider B, Shang H, Li X, Ernst E. Quality of herbal medicines: challenges and solutions. *Complement Ther Med*. 2012;20(1-2):100-6.
184. Azadpour M, Farajollahi MM, Varzi AM, Hadipour F, Barati M. The evaluation of cytotoxicity effects of *Rheum ribes L.*(rubarb) extract on cancer cell lines and its antibacterial and mutagenicity activity. evaluation. 2020;7(3).

185. Abudayyak M. *In vitro* evaluation of *Rheum ribes* induced genotoxicity in HepG2 cell lines. *Istanbul Journal of Pharmacy*. 2019;49(3):132-6.
186. Hong J-Y, Chung H-J, Bae SY, Trung TN, Bae K, Lee SK. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of cancer prevention*. 2014;19(4):273.
187. Cui Y, Chen LJ, Huang T, Ying JQ, Li J. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chin J Nat Med*. 2020;18(6):425-35.
188. Vancheri C. Idiopathic pulmonary fibrosis: an altered fibroblast proliferation linked to cancer biology. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2012;9(3):153-7.
189. Roberts MJ, Broome RE, Kent TC, Charlton SJ, Rosethorne EM. The inhibition of human lung fibroblast proliferation and differentiation by Gs-coupled receptors is not predicted by the magnitude of cAMP response. *Respiratory Research*. 2018;19(1):1-13.
190. Leung MY, Liu C, Zhu LF, Hui YZ, Yu B, Fung KP. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera L. var. chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology*. 2004;14(6):501-10.
191. Liu C, Leung MY, Koon JC, Zhu LF, Hui YZ, Yu B, et al. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera L. var. chinensis* (Haw.) Berg. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(11):1634-41.
192. Thunyakitpibal P, Ruangpornvisuti V, Kengkwasing P, Chokboribal J, Sangvanich P. Acemannan increases NF- $\kappa$ B/DNA binding and IL-6/-8 expression by selectively binding Toll-like receptor-5 in human gingival fibroblasts. *Carbohydr Polym*. 2017;161:149-57.
193. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpibal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J Pharmacol Sci*. 2009;109(4):525-31.
194. Boonyagul S, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpibal P. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. *Odontology*. 2014;102(2):310-7.
195. Lee YS, Lee YJ, Park SN. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* Extracts and Potential as a Plant-Derived Natural Preservative. *J Microbiol Biotechnol*. 2018;28(11):1814-22.
196. Wang C, Su W, Su X, Ni G, Liu T, Kong Y. Synergy Effects of Three Plant Extracts on Protection of Gastric Mucosa. *Nat Prod Commun*. 2015;10(11):1989-91.
197. Fäßler F, Javoor MG, Schur FK. Deciphering the molecular mechanisms of actin cytoskeleton regulation in cell migration using cryo-EM. *Biochem Soc Trans*. 2023;51(1):87-99.

## **8 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

## **9 Tabellarischer Lebenslauf**